

Epigenetische Regulation der konservierten Serinprotease HtrA1

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie und Geografie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Inga Christine Irle

aus Gera
Oktober 2009

Datum der Disputation: 16. Dezember 2009

Vorsitz des Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Küppers

Prüfer: Prof. Dr. Ehrmann, Prof. Dr. Bayer, Prof. Dr. Nalbant

Teile dieser Dissertation sind in folgenden Publikationen enthalten:

Irle, I., Schmidt N., Tennstaedt A., Parry L., Lewandrowski U., Clarke A., Ehrmann M., "Suppression of the methyl-CpG binding protein MBD2 induces HtrA1 expression" (in Vorbereitung)

Tennstaedt, A., Truebestein, L., Hauske, P., Schmidt, N., Irle, I., Kaiser, M., Brandt, R., Sickmann, A., Egensperger, R., Baldi, A., Dehmelt, L. und Ehrmann M., "HtrA1 is a tau protease" (in Vorbereitung)

Schmidt, N., Irle, I., Tennstädt, A., Greenow, K., Johannes, C., Parry L., Tourné, H., Clarke, A., Ehrmann, M., "Serine protease HtrA1 plays a crucial role in chromosomal instability" (in Vorbereitung)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Michael Ehrmann für die Möglichkeit der Promotion im Rahmen des Graduiertenkollegs, die Überlassung des interessanten Themas und die stete Bereitschaft zu anregenden Diskussionen und konstruktiver Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Beteiligten des Graduiertenkollegs. Die Diskussionen im Rahmen der Vorlesungen und Seminare waren immer wieder ein Denkanstoß.

Prof. Dr. Perihan Nalbant und Prof. Dr. Peter Bayer danke ich für die Unterstützung im Rahmen des Promotionskomitees.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen in der Abteilung Mikrobiologie II möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft in allen Belangen des Laboralltags, die interessanten Diskussionen, aber auch die vielen netten Stunden außerhalb des Labors bedanken.

Prof. Dr. Lee Parry danke ich für die DNA- und RNA-Proben aus den APC^{Min/+}-Mäusen.

Dr. Urs Lewandrowski danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Dr. Sonja Hasenbein, Nina Schmidt und Dr. Annette Tennstädt danke ich für das rasche und sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Nina Schmidt und Dr. Annette Tennstädt möchte ich außerdem für die zahlreichen Diskussionsrunden, die oft zur Problemlösung und Ideenfindung führten, herzlich bedanken.

Christiane Lütticke, Dr. Vanda Lux, Nicolette Mamant, Dr. Michael Meltzer, Dr. Melisa Merdanovic, Simon Pöpsel und Juliane Weski danke ich für die sehr nette Zusammenarbeit.

Helmut Tourné und Adam Zawistowski möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft im Laboralltag danken.

Meinen Eltern, Christine und Dr. Michael Schröder, die mir mit ihrer unermüdlichen Unterstützung meine Ausbildung ermöglicht haben und mir in allen Belangen immer beistehen, möchte ich an dieser Stelle besonders danken.

Meinem Mann, Sebastian Irle, danke ich herzlich für seine Geduld, für die Lösung sämtlicher Computerprobleme und dafür, mir in stressigen Zeiten stets den Rücken freigehalten zu haben.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG	14
1.1 Epigenetik	14
1.2 Histonmodifikationen	14
1.3 DNA-Methylierung und ihre Mediatoren	16
1.4 Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung	18
1.4.1 MeCP2	20
1.4.2 MBD1	21
1.4.3 MBD2	22
1.4.4 MBD3	23
1.4.5 MBD4	24
1.4.6 Kaiso	25
1.5 Die DNA-Methylierung in Tumorzellen	26
1.6 Das klassische Modell der klonalen genetischen Krebsentstehung	27
1.7 Die Bedeutung der epigenetischen Geninaktivierung für die Kanzerogenese	28
1.8 Die tumorsuppressive Funktion von Proteasen	30
1.9 Die Familie der HtrA-Proteasen	32
1.9.1 Die humanen HtrAs	33
1.9.2 HtrA1	34
1.9.3 HtrA2	35

1.9.4	HtrA3	36
2	ZIEL DER ARBEIT	37
3	MATERIAL UND METHODEN	38
3.1	Material	38
3.1.1	Bakterienstämme	38
3.1.2	Nährmedien	38
3.1.3	Antibiotika	39
3.1.4	Eukaryotische Zelllinien	39
3.1.5	Zellkulturmedien und Zusätze	39
3.1.6	Puffer und Lösungen	40
3.1.7	Antikörper und Farbstoffe	41
3.1.8	Biochemikalien und Chemikalien	42
3.1.9	Vektoren und Plasmide	45
3.1.10	Komplettsysteme	46
3.1.11	Oligonucleotide	46
3.1.12	Verbrauchsmaterialien	48
3.1.13	Geräte	49
3.1.14	<i>Software</i>	50
3.2	Methoden	51
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	51
3.2.2	Zellbiologische Methoden	59
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	69
4	ERGEBNISSE	73
4.1	Nachweis einer CpG island im Bereich des HtrA1-Promotors	73
4.2	Vergleich der HtrA1-Genexpression in verschiedenen humanen Zelllinien	76
4.3	Der Einfluss epigenetischer Pharmazeutika auf die Expression von HtrA1	77
4.4	Methylierung des HtrA1-Promotors	80
4.5	Methylierung von HtrA1 in Polypen aus APC^{Min/+}-Mäusen	83
4.6	Methylierung des murinen HtrA1-Promotors und HtrA1-Expression	86
4.7	Spezifische Inhibition von MBD2 mittels shRNA	88

4.7.1	Suppression von MBD2	88
4.7.2	Expression von MBD1 und MeCP2 nach Suppression von MBD2	90
4.7.3	Expression von HtrA1 nach Suppression von MBD2	92
4.8	Reinigung von MBD2b	94
4.9	Reinigung der MBD von MBD2	95
4.10	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	96
4.11	Einfluss verschiedener Substanzen auf die DNA-Bindungskapazität von MBD2b	98
4.12	Isothermale Titrationskalorimetrie eines Inhibitors von MBD2b an methylierte DNA	100
4.13	Analyse der oligomeren Zustände von MBD2	102
4.13.1	Oligomerer Zustand von MBD2b in Abhängigkeit von der DNA-Bindung	102
4.13.2	Oligomerer Zustand der MBD _{MBD2} in Abhängigkeit von der DNA-Bindung	104
4.14	Proteolyse von MBD2b	106
4.14.1	Proteolyse von MBD2b durch HtrA1	106
4.14.2	Proteolyse von MBD2b durch HtrA1 in Anwesenheit methylierter DNA	107
4.14.3	Massenspektrometrische Analyse eines Produktes der MBD2b-Proteolyse	109
4.14.4	Bestimmung der HtrA1-Schnittstellen innerhalb des MBD2b-Proteins	109
4.15	Re-Expression von HtrA1 in Kolonkarzinomzellen	112
4.15.1	Retroviraler Gentransfer von HtrA1 in HCT116-Zellen	112
4.15.2	Subzelluläre Lokalisation von HtrA1 nach Re-Expression in HCT116	113
4.15.3	Migrationsverhalten von HCT116-Zellen nach Rekonstitution der HtrA1-Expression	114
4.15.4	Apoptose in HCT116-Zellen nach Rekonstitution der HtrA1-Expression	117
4.16	Xenograft-Modell	118
5	DISKUSSION	120
5.1	Die HtrA1-Genexpression ist epigenetisch reguliert	120
5.1.1	Epigenetische Pharmazeutika steigern die HtrA1-Expression in Kolonkarzinomzelllinien	120
5.1.2	Der HtrA1-Promotor ist in HCT116-Zellen hypermethyliert	122
5.1.3	Der HtrA1-Promotor ist in Polypen aus APC ^{Min/+} -Mäusen hypermethyliert	124
5.1.4	MBD2 reguliert die Genexpression von HtrA1	126
5.2	MBD2 als potentieller Angriffspunkt für die Etablierung neuer Therapiestrategien für Krebserkrankungen	127

5.2.1	Die Interaktion zwischen MBD2 und methylierter DNA kann durch DNA-interkalierende Substanzen inhibiert werden	129
5.2.2	MBD2b ist ein Substrat von HtrA1	133
5.3	Einfluss der Re-Expression von HtrA1 auf verschiedene zelluläre Prozesse	135
5.3.1	HtrA1 ist sowohl intrazellulär, als auch extrazellulär lokalisiert	135
5.3.2	HtrA1 inhibiert die Migration	136
5.3.3	Die Rekonstitution von HtrA1 hat keinen Einfluss auf die Apoptose in HCT116-Zellen	137
5.3.4	Auswirkungen der HtrA1-Rekonstitution in Nacktmaustumoren	138
5.4	Modell für die epigenetische Regulation von HtrA1 in Tumorzellen und die Konsequenzen für die Zelle	139
5.5	Ausblick - Weitere funktionelle Charakterisierung von HtrA1 und Identifikation von MBD2-Inhibitoren	141
6	ZUSAMMENFASSUNG	143
	LITERATURVERZEICHNIS	145
	LEBENS LAUF	161

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Histonmodifikationen des Nucleosoms	15
Abb. 1.2: Cytosin-Methylierung von DNA	16
Abb. 1.3: Die Familie der Methyl-CpG-bindenden Proteine	19
Abb. 1.4: Epigenetische Regulation der Genexpression	20
Abb. 1.5: Epigenetische, durch MBD-Proteine vermittelte Transkriptionsinaktivierung	24
Abb. 1.6: Das Modell der klonalen genetischen Krebsentstehung	27
Abb. 1.7: Das Modell des epigenetischen Progenitors der Krebsentstehung	29
Abb. 1.8: Die funktionelle Bedeutung von Anti-Tumor-Proteasen	31
Abb. 1.9: Die Substrate ausgewählter Anti-Tumor-Proteasen	32
Abb. 1.10: Die Domänenorganisation ausgewählter HtrA-Familienmitglieder	33
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der humanen HtrA1-Promotorregion	73
Abb. 4.2: Ergebnis der Untersuchung der humanen HtrA1-Promotorregion hinsichtlich des Vorhandenseins einer <i>CpG island</i>	74
Abb. 4.3: Ergebnis der Untersuchung der murinen HtrA1-Promotorregion hinsichtlich des Vorhandenseins einer <i>CpG island</i>	75
Abb. 4.4: Expression von HtrA1 in verschiedenen Zelllinien	76
Abb. 4.5: HtrA1-Expression nach Behandlung mit 5-Aza-dC und TSA.	79
Abb. 4.6: Schematische Darstellung der humanen HtrA1-Promotorregion und der mittels BSP untersuchten Bereiche	81
Abb. 4.7: Methylierung des humanen HtrA1-Promotors zwischen -388 bp und -115 bp	82
Abb. 4.8: Methylierung des humanen HtrA1-Promotors zwischen 286 bp und 484 bp	83
Abb. 4.9: Schematische Darstellung der murinen HtrA1-Promotorregion und des auf die Methylierung hin untersuchten Bereiches	84
Abb. 4.10: Methylierung des murinen HtrA1-Promotors zwischen -252 bp bis -12 bp in Polypen, die aus einer APC ^{Min/+} -Maus isoliert wurden	85
Abb. 4.11: Methylierung des murinen HtrA1-Promotors zwischen -252 bp und -12 bp in Polypen, die aus verschiedenen APC ^{Min/+} -Mäusen isoliert wurden	87
Abb. 4.12: HtrA1-Expression in verschiedenen Polypen aus APC ^{Min/+} -Mäusen und MEF-Zellen	88
Abb. 4.13: Expression von MBD2 nach viraler Transduktion von shMBD2b	89
Abb. 4.14: Expression von MBD1 nach viraler Transduktion von shMBD2b	91
Abb. 4.15: Expression von MeCP2 nach viraler Transduktion von shMBD2b	92
Abb. 4.16: Expression von HtrA1 nach viraler Transduktion von shMBD2	93
Abb. 4.17: Reinigung von MBD2b	94
Abb. 4.18: Reinigung der MBD _{MBD2}	95
Abb. 4.19: Schematische Darstellung der HtrA1-Promotorregion und der mittels eines EMSAs analysierte Promotorausschnitt	96
Abb. 4.20: EMSA mit MBD2b und verschiedenen DNA-Oligonucleotiden	97

Abb. 4.21: Grundstruktur der im HTS identifizierten inhibitorisch wirksamen Substanzen	98
Abb. 4.22: EMSA mit verschiedenen Substanzen, die Derivate der im HTS identifizierten Inhibitoren von MBD2 darstellen	99
Abb. 4.23: Inhibitoren der Interaktion zwischen MBD2b und methylierter DNA	100
Abb. 4.24: Bindung von Substanz YKS00178 an MBD2b	101
Abb. 4.25: Bindung von Substanz YKS00178 an das methylierte HtrA1-Oligonucleotid	102
Abb. 4.26: Gelfiltrationsanalyse von MBD2b	103
Abb. 4.27: Analytische Gelfiltration der MBD _{MBD2} in An- und Abwesenheit des HtrA1-Oligonucleotids	105
Abb. 4.28: Proteolyse von MBD2b durch HtrA1	107
Abb. 4.29: Proteolyse des an methylierte DNA gebundenen MBD2b durch HtrA1	108
Abb. 4.30: Ergebnis der LC-ESI-MS-Analyse	109
Abb. 4.31: Übersicht der HtrA1-Schnittstellen innerhalb des MBD2b-Proteins	110
Abb. 4.32: HtrA1-Expression in HCT116-Zellen nach viraler Transduktion von HtrA1	112
Abb. 4.33: Lokalisation von HtrA1 in HCT116-Zellen	113
Abb. 4.34: Wundheilungs-Assay mit HCT116-Zellen nach Re-Expression von HtrA1	115
Abb. 4.35: 3D-Migrations-Assay mit HCT116-Zellen nach Re-Expression von HtrA1	116
Abb. 4.36: Apoptose-Assay mit HCT116-Zellen nach Rekonstitution der HtrA1-Expression	117
Abb. 4.37: Tumorstadium nach subkutaner Injektion der HCT116-Zellen mit und ohne HtrA1-Expression in Nacktmäuse	118
Abb. 5.1: Protein- und Oligonucleotidsequenzen	130
Abb. 5.2: Modell für die epigenetische Regulation von HtrA1 in Tumorzellen	140

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Verwendete Bakterienstämme	38
Tabelle 3.2: Verwendete Antibiotika	39
Tabelle 3.3: Verwendete eukaryotische Zelllinien	39
Tabelle 3.4: Verwendete Antikörper und Farbstoffe	41
Tabelle 3.5: Verwendete Proteine und Enzyme	42
Tabelle 3.6: Verwendete Protein- und Nucleinsäurestandards	42
Tabelle 3.7: Verwendete Plasmide	45
Tabelle 3.8: Verwendete Komplettsysteme	46
Tabelle 3.9: Verwendete QPCR-Oligonucleotide	46
Tabelle 3.10: Verwendete EMSA-Oligonucleotide	47
Tabelle 3.11: Verwendete Oligonucleotide für Bisulfit-Sequenzierungs-PCR (BSP)	47
Tabelle 3.12: Verwendete Oligonucleotide für Klonierungen	48
Tabelle 3.13: Pipettierschema für eine PCR-Reaktion	51
Tabelle 3.14: PCR-Ansatz für die direkte Bakterien-Kolonie-PCR	54
Tabelle 3.15: PCR-Ansatz für eine BSP	57
Tabelle 3.16: Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien	59
Tabelle 3.17: Selektionsbedingungen für transduzierte Zelllinien	62
Tabelle 3.18: Verdünnungen der für die Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper und Farbstoffe	64
Tabelle 3.19: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der <i>Primer</i> -Effizienz	68
Tabelle 3.20: Pipettierschema für die QPCR	68
Tabelle 4.1: K_d und ΔH für die Bindung von Substanz YKS001178 an methylierte DNA	102
Tabelle 4.2: Erwartete Molekulargewichte des MBD2b, des HtrA1-Oligonucleotids und des Komplexes aus MBD2b und HtrA1-Oligonucleotid	103
Tabelle 4.3: Oligomerisierung von MBD2b in Abhängigkeit von der Bindung an das methylierte HtrA1-Oligonucleotid	104
Tabelle 4.4: Erwartete Molekulargewichte der MBD_{MBD2} , des HtrA1-Oligonucleotids und des Komplexes aus MBD_{MBD2} und HtrA1-Oligonucleotid	105
Tabelle 4.5: Oligomerisierung der MBD_{MBD2} in Abhängigkeit von der Bindung an das methylierte HtrA1-Oligonucleotid	106
Tabelle 4.6: Anzahl der ermittelten HtrA1-Schnittstellen nach den einzelnen Aminosäuren in MBD2b	111

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
5-Aza-dC	5-Aza-2'-Deoxycytidin
A	Adenin
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
AP2α	<i>adaptor-related protein complex 2 alpha</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BSP	<i>Bisulfite sequencing PCR</i>
C	Cytosin
CDH1	Cadherin 1
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	codierende Sequenz
cm	Zentimeter
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
env	<i>envelope protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>

FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G	Guanin
gag	<i>group antigens</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GKM	<i>gatekeeper mutation</i>
H	Histon
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histone-Deacetylase
HP1H α	<i>heterochromatin protein 1 α</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HPV	Humane Papillomviren
HSulf-1	<i>Heparan Sulfate Glycosaminoglycan-6-O-endosulfatase</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
IBM	<i>inhibitor of apoptosis binding motif</i>
IGFBP	<i>insulin growth factor binding protein</i>
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
ITC	isothermale Titrationskalorimetrie
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
l	Liter
LC-ESI-MS	<i>Liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry</i>
log	Logarithmus
LSCM	<i>laser scanning confocal microscopy</i>
LV	Leervektor
M	Molar
MBD	Methyl-CpG-bindende Domäne
MeCP2	<i>methyl CpG binding protein 2</i>
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	<i>micro RNA</i>
ml	Milliliter
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteasen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
nt	Nucleotid
NZA	NZ-Amin
ONC	Oncogen

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>postsynaptic density protein 95-Discs large-Zona occuldens 1</i>
pmol	Picomol
pol	<i>reverse transcriptase</i>
POZ/BTB	<i>poxvirus and zinc finger / broad complex tramtrack bric-a-brac</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
QPCR	<i>quantitative Real-Time-PCR</i>
RASSF2A	<i>ras association domain family protein 2 isoform A</i>
Rb	<i>retinoblastoma protein</i>
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rotations per minute</i>
RSS	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamid gel electrophosis</i>
SETDB1	<i>SET domain, bifurcated 1</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Sp	<i>specificity protein</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
SS	Signalsequenz
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TM	transmembran
T _m	<i>melting temperature</i>
TPG	Tumorsuppressorgen
TRD	<i>transcriptional repressor domain</i>
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanate
TSA	Trichostatin A
ÜN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus G</i>
Wnt	<i>wingless-int</i>
Xist	<i>X inactive specific transcript</i>

Aminosäuren wurden entsprechend der IUPAC-Nomenklatur im Ein- oder Dreibuchstabencode angegeben.

1 Einleitung

1.1 *Epigenetik*

Conrad Waddington (1905-1975) prägte 1942 den Begriff Epigenetik als Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, die den Phänotyp hervorbringen (Waddington 1942). Die Epigenetik ist die Brücke zwischen Genotyp und Phänotyp und wird im 21. Jahrhundert definiert als das Studium der erblichen Veränderungen in der Genomfunktion, die ohne eine Änderung der DNA-Sequenz auftreten (Jones, Baylin 2007, Goldberg, Allis & Bernstein 2007). Obwohl die Mehrheit der Zellen in einem multizellulären Organismus einen identischen Genotyp aufweist, werden im Laufe der Entwicklung des Organismus diverse Zelltypen mit sich unterscheidenden Genexpressionsprofilen und zellulären Funktionen generiert (Goldberg, Allis & Bernstein 2007).

Die epigenetischen Informationen sind als chemische Modifikationen der Cytosinbasen und der Histonproteine, die das Genom verpacken, gespeichert. Durch Regulation der Chromatinstruktur und der DNA-Zugänglichkeit manifestieren diese chemischen Veränderungen diverse Entwicklungsstadien, Gewebetypen und Krankheitsstadien (Bird 2002, Goll, Bestor 2005, Margueron, Trojer & Reinberg 2005). In den letzten Jahren konnten große Fortschritte gemacht werden, die die Charakterisierung der epigenetischen Modifikationen ermöglicht haben. Die epigenetischen Modifikationen können in zwei Kategorien eingeteilt werden, die Histonmodifikationen (1.2) und die DNA-Methylierung (1.3).

1.2 *Histonmodifikationen*

Die genetische Information wird in Form des Chromatin-Polymers zu Strukturen höherer Ordnung innerhalb der Zelle verpackt. Die grundlegende Einheit des Chromatins ist das Nucleosom, eine Struktur bestehend aus einem Oktamer aus den vier Kern-Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4, um welches 147 bp der DNA gewickelt sind. Das Histon H1

Dargestellt ist das Nucleosom mit acht aminoterminalen flexiblen Domänen und zwei C-terminalen

Die A-Teil ist ein **Lehrplan** für die **Lehrkräfte**. Er enthält die **Lehrpläne** für die **Lehrkräfte** und die **Lehrpläne** für die **Lehrkräfte**.

Unterschiedliche Histonmodifikationen können sich durch die Aktivität von Proteinkomplexen.

kreieren, der von nukleären Proteinen gelesen und interpretiert werden kann (Jenuwein, Allis 2001, Turner 2002).

1.3 DNA-Methylierung und ihre Mediatoren

Die Methylierung von DNA ist einer der wichtigsten Mechanismen für das epigenetische Abschalten von Genen in Säugetieren. Die DNA von Vertebraten wird kovalent durch die Methylierung des Cytosins in der Dinucleotid-Sequenz 5'CpG3' modifiziert. Die Methyl-Einheit des Methylcytosins befindet sich in der großen Furche der DNA-Helix, wo viele DNA-bindende Proteine Kontaktflächen zur DNA besitzen, und beeinflusst so die Affinität dieser Proteine zur DNA (Abb. 1.2). In Säugetieren werden DNA-Methylierungsmuster in der Embryonalentwicklung etabliert und bleiben während der Zellteilung erhalten. Die Vererbbarkeit der DNA-Methylierungsmuster erlaubt die stabile epigenetische Markierung des Genoms über viele Zellteilungen hinweg. Demzufolge kann die DNA-Methylierung als zelluläres Gedächtnis bezeichnet werden.

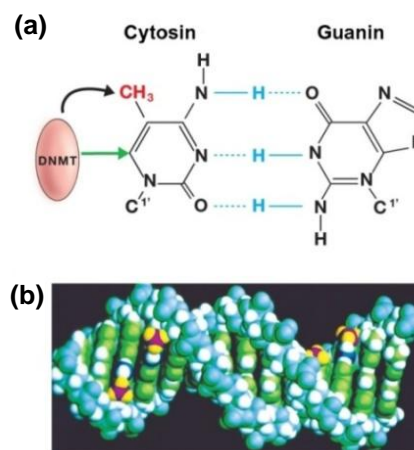


Abb. 1.2: Cytosin-Methylierung von DNA

(a) Das Hinzufügen einer Methyleinheit an Position 5 des Cytosinrings interferiert sterisch nicht mit der Basenpaarung (blaue Linien). Die DNA-Methyltransferase ist während des Methylgruppentransfers kovalent mit dem Kohlenstoff an Position 6 (grüner Pfeil) assoziiert. (b) Die Methyleinheiten (magenta und gelb) liegen innerhalb der großen Furche der Doppelhelix (Allis, Jenuwein & Reinberg 2007).

Die Methylierung der DNA wird durch die Familie der DNA-Methyltransferase-Enzyme (DNMTs) vermittelt. Das Anfügen einer Methylgruppe an Position 5 des Cytosins durch die Mitglieder dieser Protein-Familie erfolgt nur, wenn auf das Cytosin ein Guaninnucleotid in 3'-Richtung folgt.

DNMT1 hat eine 5 bis 30fach erhöhte Präferenz für hemimethylierte Substrate. Diese Eigenschaft führte dazu, dass DNMT1 als die DNA-Methyltransferase klassifiziert wurde, die das Methylierungsmuster aufrecht erhält. DNMT3a und DNMT3b wurden wenig später identifiziert und als Enzyme beschrieben, die für die *de novo*-Methylierung verantwortlich sind (Okano *et al.* 1999). Obwohl die DNMTs ursprünglich als Aufrechterhaltungs- oder *de novo* DNMTs klassifiziert wurden, gibt es inzwischen Hinweise darauf, dass alle drei DNMTs nicht nur kooperieren, sondern sowohl Aufrechterhaltungs-, als auch *de novo*-Funktionen *in vivo* besitzen (Rhee *et al.* 2000, Rhee *et al.* 2002, Kim *et al.* 2002, Paz *et al.* 2003b).

Das Dinucleotid CpG ist im humanen Genom unterrepräsentiert, was auf das häufige Auftreten spontaner Deaminierungen des 5-Methylcytosins zu Thymin zurückzuführen ist (Bird 1986). Die DNA-Methylierung trägt aufgrund dieses intrinsischen Mutationspotentials zwar indirekt, aber signifikant zur Entstehung genetischer Krankheiten bei. Trotz der geringen CpG-Frequenz innerhalb des Genoms enthalten die Hälfte der humanen Gen-Promotoren CpG-reiche Regionen mit einer Länge zwischen 0,5 kb und mehreren kb, die als *CpG islands* bezeichnet werden (Bird 1986). Der Großteil dieser *CpG islands* ist mit sogenannten *house-keeping* Genen assoziiert. Die Hälfte der gewebsspezifischen Gene weist jedoch ebenfalls eine *CpG island* innerhalb ihres Promotors auf (Bird 1986). Typischerweise sind *CpG islands* während der gesamten Entwicklung vollständig unmethyliert und erlauben die Expression des jeweiligen Gens, wenn der entsprechende Transkriptionsfaktor vorhanden und die Chromatinstruktur zugänglich ist.

CpG islands befinden sich meist innerhalb der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) und des ersten Exons eines Gens. Einzelne *CpG islands* sind jedoch innerhalb des Gens oder in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) lokalisiert und sind häufig anfällig für Methylierung (Nguyen *et al.* 2001). Die DNA-Methylierung interferiert dabei jedoch nicht mit der RNA-Transkription (Jones 1999). Es gibt weitere Ausnahmen von der Regel, dass *CpG islands* in der normalen Zelle vollständig unmethyliert sind. Methylierte *CpG islands* spielen beispielsweise eine wichtige Rolle für das *Imprinting* von Genen und die Inaktivierung des X-Chromosoms. Das genomische *Imprinting* ist ein Mechanismus, bei dem die Expression eines Gens auf eins der beiden parental Chromosomen beschränkt ist. Säugetiere besitzen normalerweise zwei Kopien jedes Gens, wobei sowohl das maternale als auch das paternale Gen dasselbe Potential besitzen in der Zelle aktiv zu sein. Beim *Imprinting* wird jedoch ein Allel durch DNA-Hypermethylierung und Ausbildung einer hochkondensierten Chromatinstruktur früh in der männlichen oder weiblichen Keimbahn inaktiviert, so dass das jeweilige Gen nur monoallelisch exprimiert wird. Ein ähnliches Phänomen der Gendosis-Reduktion stellt die Methylierung der *CpG islands* auf einem der X-Chromosomen in

weiblichen Organismen dar, was zur Inaktivierung der Gene des methylierten X-Chromosoms führt.

1.4 Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung

Die Tatsache, dass die DNA-Methylierung die Genexpression beeinflusst, wurde in der Vergangenheit mit verschiedenen Experimenten gezeigt. Die artifizielle Methylierung der CpG-Stellen eines adenoviralen Reportergens verhindert beispielsweise die Expression des Gens nach Injektion in die Nuclei von Froschoozyten (Jones, Taylor 1980). Weitere Untersuchungen zur DNA-Methylierung genomischer DNA wurden durch die Entdeckung von 5-Azacytidin, einem DNMT-Inhibitor, ermöglicht. Das Nucleosidanalogen wird anstelle von Cytidin in die DNA inkorporiert und bildet mit DNA-Methyltransferasen ein kovalentes Addukt. Auf diese Weise kann 5-Azacytidin die Expression methylierter Gene wiederherstellen (Mohandas, Sparkes & Shapiro 1981).

Nach Etablierung des DNA-Methylierungsprofils muss das Auftreten der DNA-Modifikation in die Regulation der Genexpression übertragen werden. Ein Mechanismus, der für die Genexpressionsregulation durch die DNA-Methylierung eine Rolle spielt, ist die Inhibition der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA, die auf der Anwesenheit der Methylgruppe in der großen Furche der DNA beruht. Verschiedene Transkriptionsfaktoren erkennen GC-reiche Sequenzmotive, die CpG-Stellen beinhalten können. Einige dieser Faktoren sind nicht in der Lage an DNA zu binden, wenn die CpG-Stellen methyliert sind (Watt, Molloy 1988).

Die Genexpressionsregulation durch die DNA-Methylierung wird außerdem durch einen weiteren Mechanismus beeinflusst, der mit der spezifischen Bindung bestimmter Proteine assoziiert ist. Bei diesen Proteinen handelt es sich um die Mitglieder der Familie der Methyl-CpG-bindenden Proteine (MBD-Proteine), die eine Methyl-CpG-bindende Domäne (MBD) enthalten (Abb. 1.3). Die Proteinfamilie der MBDs besteht aus sechs gut charakterisierten Mitgliedern, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 und Kaiso, das statt einer MBD eine Zinkfinger-Domäne besitzt.

Die MBD-Proteine fungieren als Übersetzer zwischen der DNA-Methylierung und den Histon-modifizierenden Proteinen, die eine transkriptionell inaktive Chromatinumgebung kreieren.

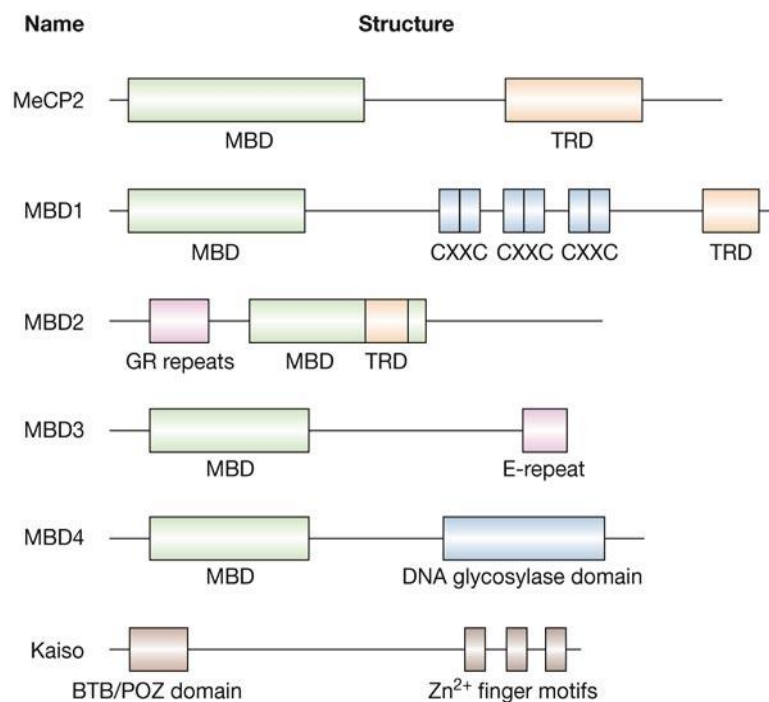


Abb. 1.3: Die Familie der Methyl-CpG-bindenden Proteine

Dargestellt ist die Domänenstruktur der sechs Mitglieder der MBD-Proteinfamilie mit ihrer charakteristischen Methyl-CpG-bindenden Domäne (grün). Weitere markierte Domänen sind die Transkriptionsrepressordomäne (TRD) (rot), CXXC-Domänen (blau) Zinkfinger (grau), GR *repeats* (lila) mit unbekannter Funktion und eine T:G *mismatch*-Glycosylase-Domäne (hellblau), die in die Reparatur von 5-Methylcytosindeaminierungen involviert ist. Kaiso bindet methylierte DNA über eine Zinkfingerdomäne und besitzt eine POB/BTB-Domäne (Sansom, Maddison & Clarke 2007).

Die MBD-Proteine MeCP2, MBD1 und MBD2 sind häufig mit hypermethylierten *CpG island*-Promotoren von Tumorsuppressorgenen assoziiert und vermitteln deren transkriptionelle Repression über eine TRD (Transkriptionsrepressordomäne). Mit Hilfe der TRD werden Proteinkomplexe rekrutiert, die für die Reorganisation des Chromatins verantwortlich sind (Abb. 1.4) (Ballestar, Esteller 2005). Die Methylierung der DNA und die Bindung der MBD-Proteine resultiert schließlich in der Kondensation des Chromatins. In diesem Zustand ist die DNA nicht zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie und die Genexpression ist dementsprechend reprimiert.

MBD3 und Kaiso sind ebenfalls Bestandteil von Proteinkomplexen, die die Transkriptionsrepression vermitteln. MBD4 hingegen besitzt keine Transkriptionsrepressionsfunktion. Es ist stattdessen in die DNA-Reparatur involviert.

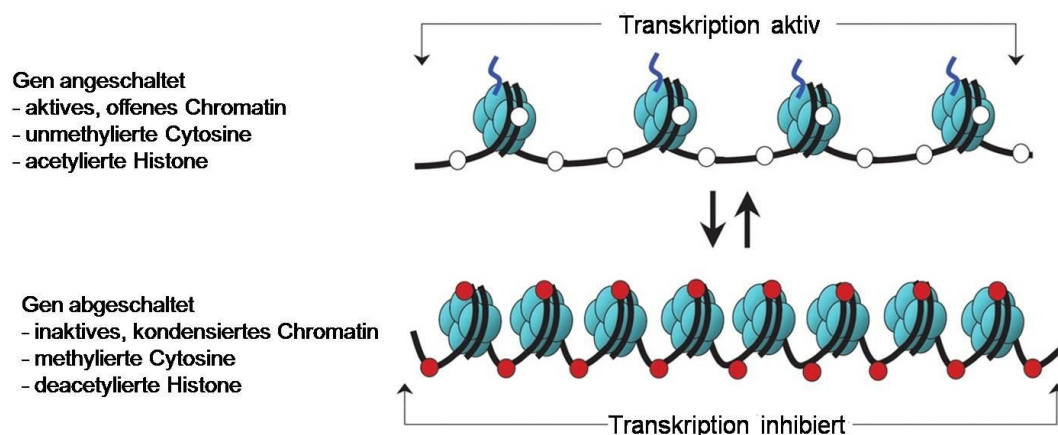


Abb. 1.4: Epigenetische Regulation der Genexpression

Schematische Darstellung der reversiblen Änderungen in der Chromatinorganisation, die die Genexpression beeinflussen. Gene werden exprimiert, wenn das Chromatin eine offene Konformation aufweist, und inhibiert, wenn das Chromatin kondensiert ist. Weiße Kreise = unmethylierte Cytosine; rote Kreise = methylierte Cytosine (Rodenhiser, Mann 2006)

Die meisten hypermethylierten Promotoren sind von MBD-Proteinen okkupiert, wobei unmethylierte Promotoren keine Interaktion mit MBD-Proteinen, außer mit MBD1, zeigen (Lopez-Serra *et al.* 2006). Die Behandlung von Krebszellen mit demethylierenden Wirkstoffen bewirkt die Demethylierung von *CpG islands*, die Freisetzung von MBD-Proteinen und die Re-Expression des Gens, was die Auffassung, dass MBD-Proteine methylierungsabhängig mit Promotoren interagieren, unterstützt. Einige Promotoren weisen dabei eine hohe Selektivität für die Rekrutierung eines bestimmten Sets von MBD-Proteinen auf, wohingegen andere Promotoren weniger selektiv sind. Diese Beobachtungen führen zu der Schlussfolgerung, dass das spezifische Profil der MBD-Protein-Okkupanz für hypermethylierte *CpG islands* gen- und tumorspezifisch ist (Lopez-Serra *et al.* 2006).

1.4.1 MeCP2

MeCP2 ist ein 50 kDa-Protein, das von einem auf dem X-Chromosom lokalisierten Gen codiert wird. Es existieren zwei *Splice*-Varianten des Proteins, MeCP α und MeCP β , die sich im Vorhandensein von Exon 2 unterscheiden.

Das MeCP2-Protein enthält eine MBD in der N-terminalen Region und eine TRD nahe des C-Terminus. Die TRD enthält außerdem ein NLS (*nuclear localization signal*). MeCP2 vermittelt die transkriptionelle Repression indem Proteinkomplexe, die den Umbau der Chromatinstruktur vermitteln, über die TRD zu der methylierten DNA-Sequenz rekrutiert werden. Dabei interagiert die TRD mit dem Sin3a-Komplex, der u.a. die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 enthält (Abb. 1.5). Die Deacetylierung der Histone führt dann zur

Bildung von Heterochromatin (Jones *et al.* 1998, Nan *et al.* 1998). Die Beobachtung, dass MeCP2 die Transkription methylierter DNA durch Rekrutierung von HDAC-enhaltenden Proteinkomplexen inhibiert, zeigte ursprünglich zum ersten Mal eine mechanistische Verbindung zwischen DNA-Methylierung und transkriptioneller Repression durch die Modifikation von Chromatin. Neben der Deacetylierung von Histonen kann MeCP2 die Repression der Transkription außerdem durch Interaktion mit einem Proteinkomplex vermitteln, der Histon H3 Lysin 9-Methyltransferase-Aktivität besitzt. Die Zusammensetzung dieses Komplexes ist jedoch noch nicht bekannt (Fuks *et al.* 2003).

MeCP2 wurde in der Vergangenheit außerdem mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Es scheint eine wichtige Rolle für die Regulation der neuronalen Differenzierung zu spielen, da Mutationen des MeCP2-Gens mit der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen assoziiert sind. Mutationen in der MBD und der TRD von MeCP2 führen beispielsweise zur Entstehung einer neurodegenerativen Erkrankung, die als Rett-Syndrom bezeichnet wird. Die Symptome des Rett-Syndroms sind u.a. mentale Retardation, Autismus, Mikroencephalie, Atembeschwerden und charakteristische Handbewegungen. Die Symptome treten im Alter von 6 bis 18 Monaten auf. Der *Knock-Out* von MeCP2 im Mausmodell führt zu Symptomen, die dem Rett-Syndrom ähnlich sind, wie z.B. zu Problemen bei der motorischen Koordination (Guy *et al.* 2001).

Neben neurodegenerativen Erkrankungen ist MeCP2 potentiell auch für Krebserkrankungen relevant, da MeCP2 eine Rolle für die Wachstumskontrolle von Krebszellen spielt. Die Inhibition von MeCP2 in Krebszellen führt zu einem Wachstumsstopp. Die ektopische Expression hat hingegen einen Wachstumsvorteil zur Folge (Bernard *et al.* 2006).

1.4.2 MBD1

MBD1 ist ein 55 kDa Protein, das von einem auf Chromosom 18 lokalisierten Gen codiert wird. MBD1 enthält eine MBD in der N-terminalen Region, eine TRD im C-terminalen Bereich und zwei oder drei CxxCxxC-Domänen, die als CxxCxxC1, CxxCxxC2 und CxxCxxC3 bezeichnet werden. Die CxxCxxC-Domänen sind zwischen der MBD und der TRD lokalisiert, wobei die Anzahl der CxxCxxC-Domänen von alternativen *Splice*-Ereignissen abhängt. Isoformen, die eine CxxCxxC3-Domäne enthalten, sind in der Lage auch unmethylierte DNA-Promotoren zu binden. Sie vermitteln dementsprechend nicht nur die Transkriptionsrepression methylierter, sondern auch unmethylierter DNA-Regionen (Fujita *et al.* 2003).

Die Repressionsaktivität von MBD1 wird durch die Rekrutierung der SETDB1 Histonmethyltransferase (Abb. 1.5), welche die Methylierung von Histon H3 Lysin 9

katalysiert, vermittelt (Klose, Bird 2006). MBD1 interagiert außerdem mit der Histonmethyltransferase (HMT) Suv39h, die ebenfalls die Methylierung von Histon H3 K9 katalysiert (Fujita *et al.* 2003).

Bisher ist wenig über die funktionelle Bedeutung von MBD1 bekannt. MBD1-*Knock-Out*-Mäuse zeigen keine Störungen in der Entwicklung und keinen auffälligen Phänotyp. Die pluripotenten neuronalen Zellen der *Knock-Out*-Mäuse weisen jedoch eine verminderte neuronale Differenzierung und Chromosomeninstabilität auf (Klose, Bird 2006).

1.4.3 MBD2

Das MBD2-Protein wird von einem Gen auf Chromosom 18 codiert. Es existieren zwei Splice-Varianten, MBD2a (43,5 kDa) und MBD2b (29,1 kDa), die sich anhand ihrer Startposition für die Translation unterscheiden. Es existiert außerdem eine Testikel-spezifische trunkierte Variante (31,7 kDa), MBD2t, mit einem alternativen Exon 4.

Das MBD2-Protein fungiert als Transkriptionsrepressor, da es Bestandteil des MeCP1-Komplexes, einem ATP-abhängigen Multiprotein-Komplex, der die Umstrukturierung des Chromatins reguliert, ist. (Abb. 1.5) Neben MBD2 enthält MeCP1 den Mi-2/NuRD-Komplex (Fatemi, Wade 2006). MBD2 stellt die DNA-bindende Domäne des Komplexes dar und rekrutiert die übrigen Komponenten des MeCP1-Komplexes über die TRD, u.a. HDAC1, HDAC2 und Mi-2. Die HDACs und Mi-2 katalysieren die Bildung von transkriptionell inaktivem Heterochromatin. Für MBD2b wurde in der Vergangenheit auch eine Funktion als Demethylase beobachtet (Bhattacharya *et al.* 1999). Das Vorhandensein dieser enzymatischen Aktivität wird jedoch kontrovers diskutiert.

Entwicklungsbiologisch ist MBD2 für die X-chromosomale Dosis-Kompensation bei weiblichen Säugetieren von Bedeutung. In der frühen Zygote sind zunächst beide X-Chromosomen aktiv. Die Inaktivierung eines X-Chromosoms erfolgt gleichzeitig mit der zellulären Differenzierung und wird durch die nicht-codierende Xist-RNA vermittelt (*X inactive specific transcript*). Diese RNA bedeckt das gesamte zu inaktivierende X-Chromosom und löst die Inaktivierung des Chromosoms durch Rekrutierung von Proteinkomplexen, welche die Reorganisation des Chromatins vermitteln, aus. MBD2 reguliert die methylierungsabhängige Repression des Xist-Gens auf dem X-Chromosom, das aktiv bleibt und trägt dementsprechend zur Aufrechterhaltung der Aktivierung des X-Chromosoms bei (Barr *et al.* 2007).

Der Verlust von MBD2 in MBD2 *Knock-Out*-Mäusen bewirkt keine Defekte in der embryonalen Entwicklung. MBD2 defiziente weibliche Mäuse zeigen jedoch ein abnormales maternales Verhalten (Hendrich *et al.* 2001). Die T-Helferzellen der *Knock-Out*-Mäuse

weisen außerdem Störungen in der Differenzierung auf, da der MBD2-Verlust mit Veränderungen der Expression einiger Cytokine, die für die T-Helfer-Zell-Differenzierung von Bedeutung sind, assoziiert ist (Hutchins *et al.* 2002).

Die Kreuzung der MBD2 *Knock-Out*-Maus in den APC^{Min/+}-Hintergrund hat gezeigt, dass MBD2 eine Rolle in der Tumorigenese des Kolorektalkarzinoms spielt. Die intestinale Tumorigenese ist in den APC^{Min/+}MBD2^{-/-}-Mäusen bis zu zehnfach reduziert. APC^{Min/+}MBD2^{-/-}-homozygote Mäuse zeigen außerdem eine signifikante Reduktion der Adenomlast und ein gesteigertes Überleben im Vergleich zu den APC^{Min/+}MBD2^{+/-}-heterozygoten Mäusen (Sansom *et al.* 2003). Der genaue Mechanismus der Tumorsuppression ist noch unklar, wobei Studien gezeigt haben, dass zahlreiche wichtige negative Regulatoren des Wnt-Signalwegs in Kolorektaltumoren transkriptionell inaktiviert sind. Sie stellen somit potentielle Ziele der MBD2-vermittelten transkriptionellen Repression dar (Suzuki *et al.* 2004).

1.4.4 MBD3

Das Gen, welches MBD3 codiert, ist auf Chromosom 19 lokalisiert und weist eine signifikante Homologie zu MBD2 auf (Hendrich, Bird 1998). MBD3 kommt in zwei *Splice*-Varianten, die sich anhand ihrer Größe unterscheiden, vor. In Säugetieren ist MBD3 nicht in der Lage an methylierte DNA zu binden, da es zwei Veränderungen in der MBD aufweist. Trotz des Nichtvorhandenseins einer funktionellen MBD spielt MBD3 eine wichtige Rolle für methylierungsabhängige Ereignisse, da es eine integrale Komponente des Mi-2/NuRD-Komplexes (Abb. 1.5), zu dem auch MBD2 gehört, ist. Dieser Komplex enthält neben MBD3 die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2, die Histon-bindenden Proteine RbAp46 und RbAp48, Mi-2, das für die Umstrukturierung des Chromatins verantwortlich ist, und MTA1 und MTA2, zwei Metastase-assoziierte Proteine. Der Proteinkomplex vermittelt die Repression der Genexpression durch Umstrukturierung des Chromatins.

Anhand eines MBD3 *Knock-Out-Maus*modells wurde gezeigt, dass MBD3 essentiell für die normale Embryogenese ist. Die MBD3 defizienten Mäuse sterben früh während der embryonalen Entwicklung (Hendrich *et al.* 2001). Diese Beobachtung macht außerdem deutlich, dass MBD2 und MBD3 *in vivo* trotz der hohen Sequenzhomologie funktionell nicht redundant sind.

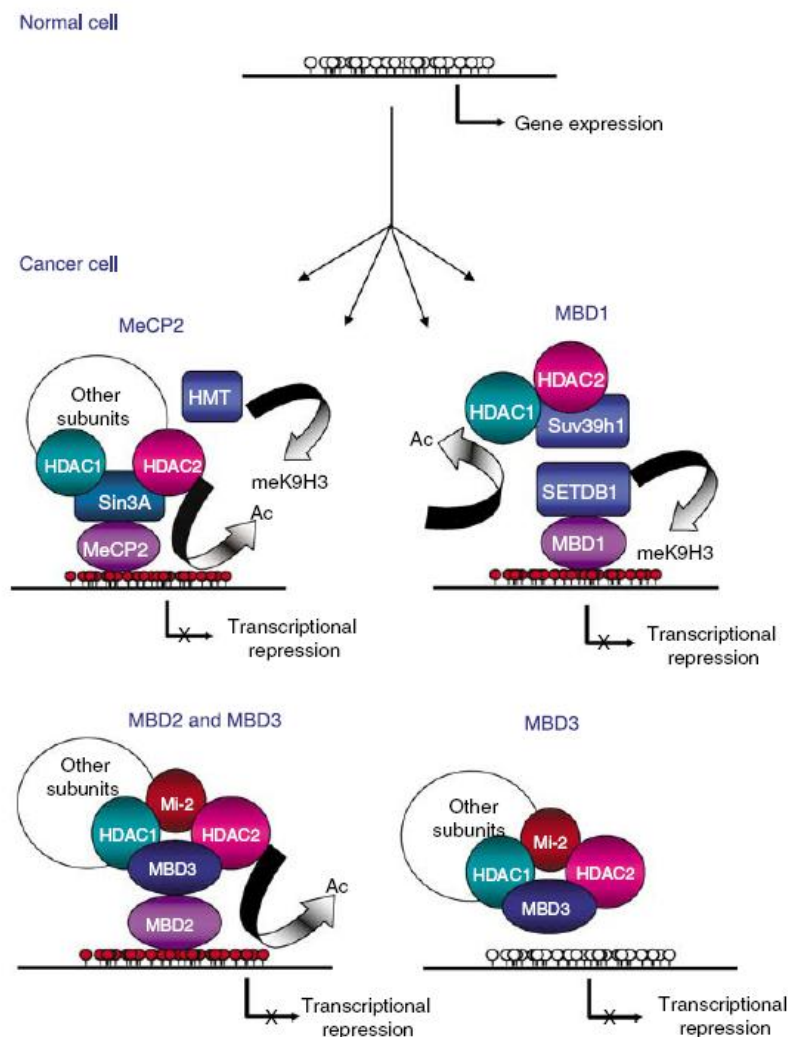


Abb. 1.5: Epigenetische, durch MBD-Proteine vermittelte Transkriptionsinaktivierung

Rote und weiße Kreise repräsentieren methylierte bzw. unmethylierte CpGs (Lopez-Serra, Esteller 2008).

1.4.5 MBD4

Im Gegensatz zu den anderen MBD-Proteinen, gibt es wenige Hinweise darauf, dass MBD4, dessen Gen auf Chromosom 3 lokalisiert ist, in der Lage ist die Transkription zu inhibieren. Stattdessen agiert MBD4 als methylierungsspezifisches DNA-Reparatur-Protein, das mit Proteinen der *mismatch repair*-Familie der DNA-Reparatur-Proteine interagiert (Bellacosa *et al.* 1999).

MBD4 weist zwei funktionelle Domänen auf, eine MBD, die direkt an hemi- oder vollständig-methylierte DNA bindet und eine C-terminale Domäne, die als Thymin-DNA-Glycosylase fungiert und Thymin oder Uracil *mismatches* in CpG-Stellen *in vitro* entfernen kann (Hendrich *et al.* 1999). Das CpG Dinucleotid ist aufgrund der häufigen hydrolytischen Deaminierung von 5-Methyl-Cytosin zu Thymin und der Deaminierung von Cytosin zu Uracil sehr anfällig

für Mutationen. Diese Deaminierungen können zwischen 2 bis 300mal pro Tag pro Zelle auftreten und würden, sofern sie nicht repariert werden, in der nächsten Runde der Replikation zu G:C und A:T-Mutationen führen (Fraga *et al.* 2003, Bellacosa 2001). Derartige Mutationen tragen häufig zur Tumorigenese bei. Etwa 50% der somatischen p53-Mutationen in Kolorektalkarzinomen entstehen beispielsweise an sogenannten *hotspots*, wo Cytosine in CpG-Dinucleotiden deaminiert sind (Kouidou, Malousi & Maglaveras 2006). Da MBD4 in der Lage ist diese Mutationen zu verhindern, übt es eine wichtige Kontrollfunktion aus.

MBD4-defiziente Mäuse sind lebensfähig und zeigen keinen offenkundigen Phänotyp (Millar *et al.* 2002). Sie weisen jedoch eine signifikant erhöhte Frequenz von Mutationen am 5-Methyl-Cytosins eines Reportes-Transgens auf (Millar *et al.* 2002, Wong, Hawkins & Ward 2007). Obwohl die MBD4^{-/-}-Mäuse keine erhöhte spontane Tumorigenese zeigen, erhöht die MBD4-Defizienz dennoch die intestinale Tumorigenese nach Kreuzung in den APC^{Min/+}-Hintergrund (Millar *et al.* 2002). Die Tumore, die in diesen Mäusen entstanden sind, weisen eine deutlich erhöhte Anzahl an Mutationen innerhalb der CpG-Stellen des APC-Allels auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MBD4 aufgrund seiner DNA-Reparatur-Funktion als Tumorsuppressor agiert.

1.4.6 Kaiso

Kaiso gehört zu den BTB/POZ-Proteinen und besitzt, im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der MBD-Proteinfamilie, keine klassische MBD, sondern eine Zinkfinger-Domäne, die am C-Terminus lokalisiert ist. Kaiso, welches X-chromosomal codiert ist, bindet an Sequenzen, die mindestens zwei konsekutive methylierte CpG-Dinucleotide aufweisen. Es vermittelt die transkriptionelle Repression über den N-CoR Corepressorkomplex, der u.a. HDAC3 enthält (Klose, Bird 2006). Neben der methylierungsabhängigen Transkriptionsrepression kann Kaiso auch als sequenzspezifischer Transkriptionsinhibitor fungieren, indem es an die Nucleotidsequenz CTGCNA (N = beliebiges Nucleotid) bindet. Die Affinität von Kaiso für diese Konsensussequenz ist höher als die Affinität für Methyl-CpG-Stellen (Daniel *et al.* 2002).

Kaiso^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig, fertil und weisen keinen offensichtlichen Phänotyp auf. Kaiso-defiziente Mäuse mit einem APC^{Min/+}-Hintergrund hingegen zeigen eine deutlich reduzierte Tumorigenese, wobei der zu Grunde liegende Mechanismus noch unklar ist (Prokhortchouk *et al.* 2006). Kaiso spielt dementsprechend eine Rolle für die Tumorigenese von Kolorektalkarzinomen. Außerdem ist die Expression von Kaiso im Tumorgewebe verändert. Eine erhöhte Expression kann in intestinalen Adenomen von APC^{Min/+}-Mäusen und in humanen Kolontumoren beobachtet werden.

1.5 Die DNA-Methylierung in Tumorzellen

Das DNA-Methylierungsmuster von neoplastischen Zellen ist im Vergleich zu normalen Zellen dramatisch verändert. Innerhalb des Genoms ist eine globale Hypomethylierung zu beobachten, lokal werden *CpG islands* hypermethyliert. Die Bedeutung der Hypomethylierung für die Tumorigenese ist noch nicht vollständig geklärt, sie wurde jedoch in der Vergangenheit mit genomischer Instabilität assoziiert (Jones, Baylin 2002).

Die Rolle der lokalen Hypermethylierung von *CpG islands* in der Tumorentstehung ist dagegen besser verstanden. Während der Tumorigenese werden zahlreiche wichtige Tumorsuppressorgene, wie z.B. p16, Rb und PTEN hypermethyliert und transkriptionell inaktiviert. Die Hypermethylierung und die transkriptionelle Repression spielen außerdem bei der Ausbildung von Chemoresistenzen eine Rolle, wie z.B. bei der Inaktivierung des *MLH1 mismatch repair*-Gens nach Cisplatin-Behandlung von Ovarialzelllinien (Strathdee *et al.* 1999). Die Cisplatin-Resistenz kann in diesen Zellen jedoch durch Behandlung mit DNA-Methylierungsinhibitoren wiederhergestellt werden (Plumb *et al.* 2000).

Die Hypermethylierungsprofile der *CpG islands* von Tumorsuppressorgen variieren je nach Tumorart stark (Costello *et al.* 2000, Esteller *et al.* 2001a). Dabei ist das Muster der epigenetischen Inaktivierung nicht nur ein Merkmal sporadischer Tumore, sondern kann auch bei Tumoren, die auf vererbte Krebserkrankungen zurückgehen, beobachtet werden (Esteller *et al.* 2001b).

Einige Tumorarten weisen typischerweise eine stärkere Methylierung der *CpG islands* auf als andere. Insbesondere in Tumoren des Gastrointestinaltraktes ist eine sehr starke Methylierung zu beobachten, wohingegen Ovarialtumore und Sarkome eine deutlich geringere Hypermethylierung zeigen (Esteller 2007). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die hypermethylierten Gene in diesen Tumorarten noch nicht identifiziert wurden. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die stärker hypermethylierten Tumorarten in Bereichen entstehen, in denen eine höhere Exposition gegenüber externen Karzinogenen besteht (Costello *et al.* 2000, Esteller *et al.* 2001a). Das für eine bestimmte Tumorart typische Hypermethylierungsprofil wird in lange etablierten humanen Krebszelllinien aufrecht erhalten (Smiraglia *et al.* 2001, Paz *et al.* 2003a). Aufgrund der Stabilität des Methylierungsmusters eignen sich Zelllinien als Modell für Untersuchungen zur DNA-Methylierung.

Warum einige *CpG islands* in Krebszellen hypermethyliert werden, während andere unmethyliert bleiben, ist bis heute nicht verstanden. Eine Hypothese ist, dass, wie bei genetischen Mutationen, die vorzugsweise Methylierung des jeweiligen Gens im Vergleich zu anderen Genen einen selektiven klonalen Vorteil zur Folge hat.

1.6 Das klassische Modell der klonalen genetischen Krebsentstehung

Im klassischen Modell der klonalen genetischen Krebsentstehung, das von Vogelstein und Kollegen vorgeschlagen wurde, wird die Tumorprogression durch eine Reihe von genetischen Veränderungen vorangetrieben, die für die kontinuierliche klonale Selektion und die Heterogenität der Tumorzellen verantwortlich sind (Abb. 1.6) (Kinzler, Vogelstein 1997).

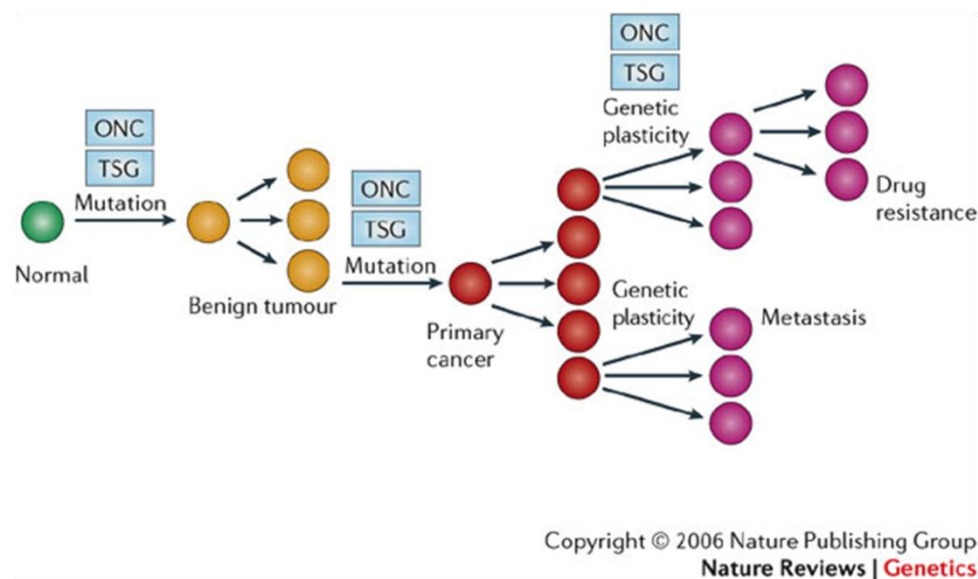


Abb. 1.6: Das Modell der klonalen genetischen Krebsentstehung

In der klassischen Sicht entsteht Krebs durch die Folge von Mutationen, die zur Aktivierung von Onkogenen (ONC) und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TSG) führen. Jede Mutation führt zu einem selektiven Wachstumsvorteil der monoklonalen Population von Tumorzellen und jede signifikante Eigenschaft des Tumors, wie z.B. Invasivität oder Metastasierung wird durch eine solche Mutation hervorgerufen. Epigenetische Veränderungen können in diesem Modell als Ersatz für die Mutationen fungieren (Feinberg, Ohlsson & Henikoff 2006).

Dieser Prozess führt schließlich zu Tumorphiliferation, Invasion, Metastasierung und Arzneimittelresistenz. Bei der Transformation einer normalen differenzierten Zelle zur Tumorzelle spielen die Aktivierung von Onkogenen und die funktionelle Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen z.B. durch Deletionen, Translokationen oder Mutationen eine große Rolle (Hanahan, Weinberg 2000). Inzwischen wurde eine große Anzahl solcher Gene identifiziert, was zu der Ansicht geführt hat, dass es sich bei Krebs um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit sich unterscheidender Ätiologie und Pathogenese handelt. Zwei der am besten verstandenen Erkrankungen, die Chronisch Myeloische Leukämie (CML) und das Kolorektalkarzinom, entstehen beispielsweise durch vollkommen unterschiedliche Mechanismen. Während die CML durch die Translokation des Philadelphiachromosoms gekennzeichnet ist (Rowley 1990), die zu einer Fusion zwischen

dem BCR-Gen auf Chromosom 9 und dem ABL-Gen auf Chromosom 22 führt, entsteht das Kolorektalkarzinom durch eine Folge von Veränderungen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, darunter APC, KRAS und p53 (Fearon, Vogelstein 1990).

1.7 Die Bedeutung der epigenetischen Geninaktivierung für die Kanzerogenese

Genetische Mechanismen sind nicht der einzige Pfad, der zur Entstehung genetischer Veränderungen führen kann. Epigenetische Veränderungen können alternativ zu Mutation und chromosomalen Veränderungen eine gestörte Genfunktion bewirken, indem sie die genetischen Veränderungen nachahmen (Egger *et al.* 2004). Dazu gehören die globale DNA-Hypomethylierung, lokale Hypermethylierung, Chromatinveränderungen und der Verlust des *Imprintings*. Alle genannten Mechanismen können zur aberranten Aktivierung von Onkogenen bzw. aberranten Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen (Feinberg, Tycko 2004).

Die Entstehung von Krebs basiert dementsprechend auf genetischen und epigenetischen Veränderungen. Das Modell des epigenetischen Progenitors berücksichtigt diese Erkenntnisse und postuliert, dass die Entstehung von Krebs in drei Stufen abläuft (Abb. 1.7). Im ersten Schritt kommt es zur epigenetischen Fehlregulation einer Vorläuferzelle, es folgt eine initiiierende Mutation und schließlich im dritten Schritt der Erwerb genetischer und epigenetischer Plastizität (Feinberg, Ohlsson & Henikoff 2006).

Der erste Schritt ist gekennzeichnet durch die epigenetische Fehlregulation einer Progenitorzelle, was zur Ausbildung einer für neoplastische Veränderungen anfälligen polyklonalen Zellpopulation führt. Diese epigenetischen Veränderungen können durch Ereignisse innerhalb der Zelle, durch Einfluss des stromalen Kompartiments, durch Umwelteinflüsse oder Verletzungen hervorgerufen werden. Es gibt verschiedene Evidenzen, die diese Hypothese stützen. Zum einen haben klassische *in vitro*-Studien gezeigt, dass der tumor-assoziierte Phänotyp sowohl in Leukämien, als auch in soliden Tumoren stabil aber reversibel ist, was einen epigenetischen Mechanismus impliziert (Sachs 1986, Lotem, Sachs 2002). Weiterhin weisen alle Tumore Veränderungen der DNA-Methylierung wie z.B. globale Hypomethylierung (Feinberg, Vogelstein 1983, Goelz *et al.* 1985) und lokale Hypermethylierung (Issa *et al.* 1994, Holst *et al.* 2003, Crawford *et al.* 2004) auf. Diese epigenetischen Veränderungen müssen den initialen genetischen Veränderungen voraus

gehen, da die epigenetische Alterationen bereits in benignen neoplastischen Stadien nachgewiesen werden können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein muriner Melanomnucleus nach Transplantation in eine entkernte Oozyte die Differenzierung in somatische Gewebe initiieren kann. Der Großteil der phänotypischen Eigenschaften der Tumorzelle wird demzufolge durch epigenetische Mechanismen, die an der Entstehung des Tumors beteiligt sind, hinsichtlich einer normalen Entwicklung reprogrammiert (Hochedlinger *et al.* 2004).

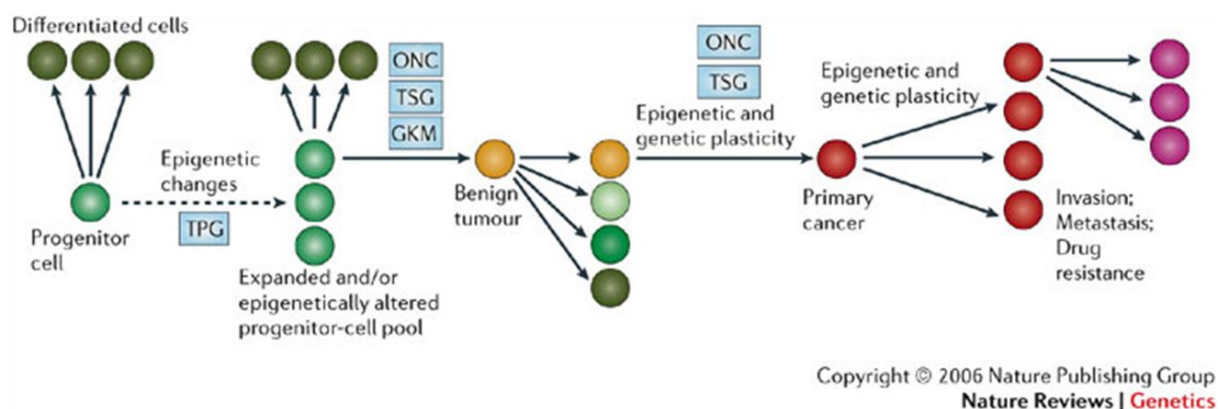


Abb. 1.7: Das Modell des epigenetischen Progenitors der Krebsentstehung

Bei diesem Modell verläuft die Krebsentstehung über einen dreistufigen Prozess. Der erste Schritt ist das Auftreten epigenetischer Veränderungen innerhalb von Stamm-/Progenitorzellen, was durch die aberrante Regulation von Tumorsuppressorgenen (TPG) vermittelt wird. Der zweite Schritt ist das Auftreten einer *gatekeeper*-Mutation (GKM) in soliden Tumoren oder die Reorganisation eines Onkogens (ONC) bei Leukämien oder Lymphomen. Der dritte Schritt umfasst die Ausbildung genetischer und epigenetischer Plastizität (Feinberg, Ohlsson & Henikoff 2006).

Im zweiten Schritt der Krebsentstehung entsteht eine initiale Mutation innerhalb der Subpopulation der epigenetisch veränderten Progenitorzellen. Dieses Ereignis wurde bisher als der erste Schritt der Tumorentstehung angesehen. Diese initiierenden Mutationen sind spezifisch für den jeweiligen Tumortyp. Mutationen in Genen, die für APC oder β -Catenin codieren sind z.B. spezifisch für Kolorektalkrebs, die Reorganisation des BCR-ABL hingegen ist typisch für die CML. Epigenetische Veränderungen können dabei, wie bereits erwähnt, die Onkogen-Aktivierung oder Tumorsuppressorgen-Inaktivierung substituieren.

Im dritten Schritt werden genetische und epigenetische Plastizität entwickelt, so dass genetische und epigenetische Schäden akkumulieren, was die Progression der Erkrankung weiter fördert. Ein Beispiel für die Steigerung der genetischen Plastizität ist die Induktion der Telomerase und die damit einhergehende Induktion der Telomer *de novo*-Synthese. In der normalen Zelle, in der keine Telomeraseaktivität nachweisbar ist, kommt es zur Verkürzung der Chromosomen und damit zu einer Begrenzung der Anzahl der Zellteilungen, der sich

eine Zelle unterziehen kann. Entartete Zellen können sich hingegen aufgrund der Telomerase-Induktion unendlich oft teilen (Sharpless, DePinho 2004).

Epigenetische Instabilität kann die Tumorprogression z.B. durch pleiotrope Veränderungen in der Expression von Genen fördern, die für Chromatin-modifizierende Produkte codieren. Die Expression von HP1Hα reguliert beispielsweise die Invasivität von Krebszellen (Kirschmann *et al.* 2000).

Dieses dreistufige Modell der Tumorentstehung, dass die Existenz von epigenetisch veränderten Progenitorzellen postuliert, impliziert, dass die frühesten Stadien der neoplastischen Progression beginnen, lange bevor eine benigne neoplastische Läsion erkennbar ist. Dies steht im Kontrast zu dem bisher akzeptierten Modell, dass Krebs einen monoklonalen Ursprung hat und sich aus einer initialen Mutation entwickelt. (Feinberg, Ohlsson & Henikoff 2006).

1.8 Die tumorsuppressive Funktion von Proteasen

Proteasen spielen eine fundamentale Rolle in biologischen Prozessen und sind assoziiert mit verschiedenen pathologischen Zuständen, u.a. mit Krebs (Lopez-Otin, Overall 2002). Das humane Degradom umfasst etwa 569 Proteasen und deren Homologe, die in fünf Klassen eingeteilt werden: 194 Metalloproteasen (MMPs), 176 Serinproteasen, 150 Cysteinproteasen, 28 Threoninproteasen und 21 Aspartatproteasen (Puente, Lopez-Otin 2004).

Proteasen wurden bereits im Jahr 1946 mit Krebs in Verbindung gebracht, als Fischer vorschlug, dass die Tumor-assoziierte proteolytische Aktivität für die Degradation der Zellmatrix und der folgenden Invasion des Tumors in das normale Gewebe verantwortlich ist (Fischer 1946). Fischers Konzept fokussierte sich auf extrazelluläre und perizelluläre proteolytische Prozesse, sowie die Degradation von Matrixkomponenten und die Förderung der Invasion und Metastasierung. In den 1970er Jahren wurden sekretierte Serin- und Cysteinproteasen und MMPs identifiziert, die prometastatische Funktionen besitzen. In den folgenden zwei Dekaden haben molekularbiologische Studien zur Identifikation zahlreicher weiterer Proteine geführt, die in der zellulären Invasion eine Rolle spielen. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass die proteolytischen Enzyme für alle Phasen der Tumorprogression von Bedeutung sind (Borgono, Diamandis 2004, Egeblad, Werb 2002, Mohamed, Sloane 2006). Intrazelluläre und extrazelluläre Proteasen können in verschiedenen zellulären Prozessen als Signalmoleküle fungieren, die für die Entstehung von Krebs von Bedeutung sind. Zu

diesen Protease-regulierten Prozessen gehören Proliferation, Adhäsion, Migration, Differenzierung, Angiogenese, Seneszenz und Apoptose.

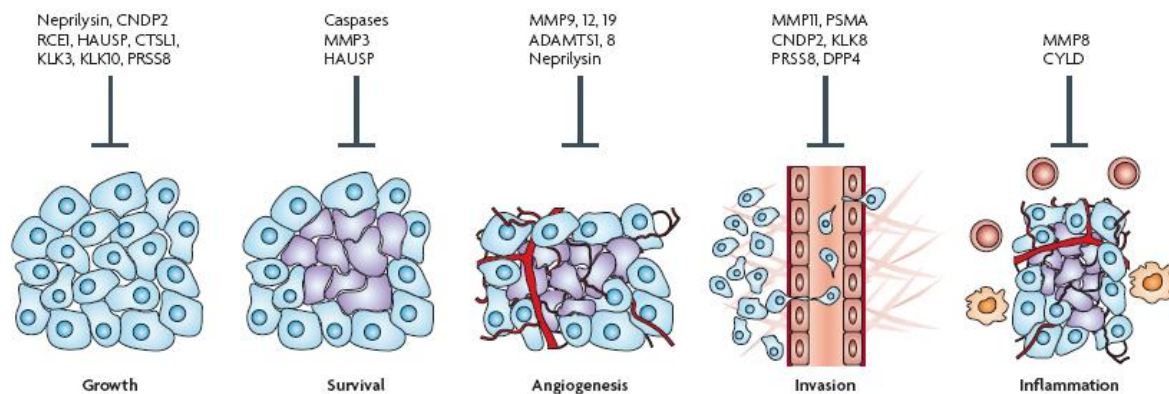


Abb. 1.8: Die funktionelle Bedeutung von Anti-Tumor-Proteasen

Proteasen verschiedener Klassen besitzen Tumorsuppressorfunktion und inhibieren verschiedene Stadien der Tumorentwicklung, wie z.B. die Angiogenese und die Invasion (Lopez-Otin, Matrisian 2007).

Die Funktion intrazellulärer Proteasen in Signalkaskaden ist im Allgemeinen mit der Entfernung von defekten oder unerwünschten Produkten assoziiert. Die Organisation der intrazellulären Enzyme innerhalb proteolytischer Kaskaden fungiert dabei als protektiver Mechanismus. In verschiedenen humanen Tumoren können Mutationen zum Verlust der Proteasefunktion führen, wie z.B. die Inaktivierung der Caspase 8 im Neuroblastom (Teitz *et al.* 2000). Die aberrant inaktivierten Proteasen fungieren somit als Tumorsuppressorgene (Teitz *et al.* 2000, Hoeller, Hecker & Dikic 2006).

Extrazelluläre Proteasen sind aktiv an der Tumorigenese beteiligt und werden in malignem Gewebe häufig überexprimiert, wie z.B. MMPs (Egeblad, Werb 2002). Neuere Studien haben gezeigt, dass außerdem extrazelluläre Proteasen existieren, die Anti-Tumor-Eigenschaften besitzen (Balbin *et al.* 2003, McCawley *et al.* 2004, Overall, Kleinfeld 2006). Der Verlust der Collagenase-2-Funktion geht beispielsweise mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Tumoren der Haut einher (Balbin *et al.* 2003). Diese Ergebnisse verdeutlichen die paradoxe Funktion der extrazellulären Proteasen für die Tumorprogression. Die molekularen Mechanismen der Tumorsuppressor-Proteasen sind demnach sehr unterschiedlich und betreffen alle Stadien der Tumorprogression (Abb. 1.8). Zu diesen molekularen Mechanismen gehören die negative Regulation des Zellwachstums und Zellüberlebens durch die CYLD Cysteinprotease, verschiedene MMPs und Serinproteasen (Egeblad, Werb 2002, Massoumi *et al.* 2006, Ramirez-Montagut *et al.* 2004) Veränderungen der Zelladhäsion durch DPP4 (Wesley, McGroarty & Homoyouni 2005), die Inhibition der Angiogenese durch Neprilysin und MMPs (Houghton *et al.* 2006, Jost *et al.* 2006, Goodman *et al.* 2006), die

Stimulation der Apoptose durch MMPs und Caspasen (Egeblad, Werb 2002, Stupack *et al.* 2006), die Aktivierung der Autophagozytose durch Autophagin 3 (Marino *et al.* 2007) und die Modulation der Entzündungsantwort durch MMPs (Balbin *et al.* 2003).

Diese protektiven Effekte resultieren aus der Fähigkeit dieser Enzyme eine große Anzahl von Substraten, wie z.B. Wachstumsfaktoren, proapoptotische Liganden, Zelladhäsionsmoleküle, Chemokine, Cytokine oder andere Proteasen, selektiv zu schneiden, (Abb. 1.9).

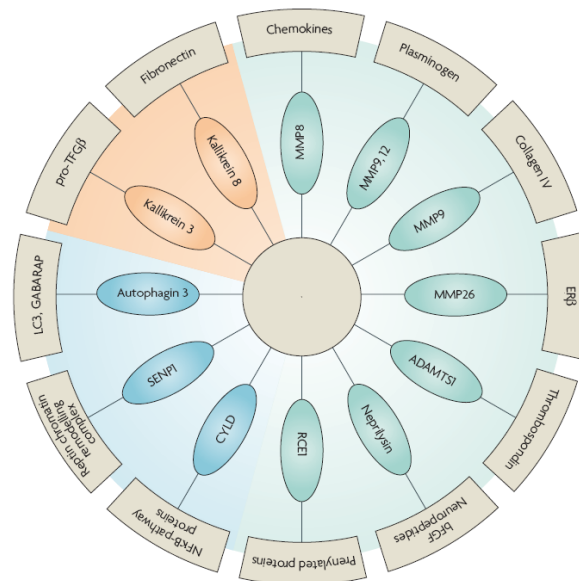


Abb. 1.9: Die Substrate ausgewählter Anti-Tumor-Proteasen

Die Proteasen (innerhalb der Ellipsen) entwickeln ihre tumorsuppressive Funktion durch Proteolyse ihrer Substrate (äußerer Ring) (Lopez-Otin, Matrisian 2007).

Dennoch sind zahlreiche Mechanismen, die der tumorsuppressiven Funktion von Proteasen zu Grunde liegen, immer noch unbekannt. Die Identifikation der *in vivo*-Substrate dieser Enzyme ist essentiell, um neue mechanistische Erkenntnisse zu erlangen und die Relevanz dieser Enzyme als Tumorsuppressoren zu validieren.

1.9 Die Familie der HtrA-Proteasen

Die Familie der HtrA-Proteasen umfasst eine Klasse hochkonservierter oligomerer Serinproteasen. Als gemeinsames Merkmal der über 180 Familienmitglieder gilt das Vorhandensein mindestens einer C-terminalen PDZ-Domäne und einer katalytischen Domäne, die der Trypsin-Protease ähnelt. Der variable N-Terminus verfügt bei einigen HtrAs über eine Signalsequenz (Abb. 1.10) (Clausen, Southan & Ehrmann 2002). Prokaryotische

HtrAs spielen eine wichtige Rolle in der bakteriellen Stressantwort und der Pathogenizität (Pallen, Wren 1997).

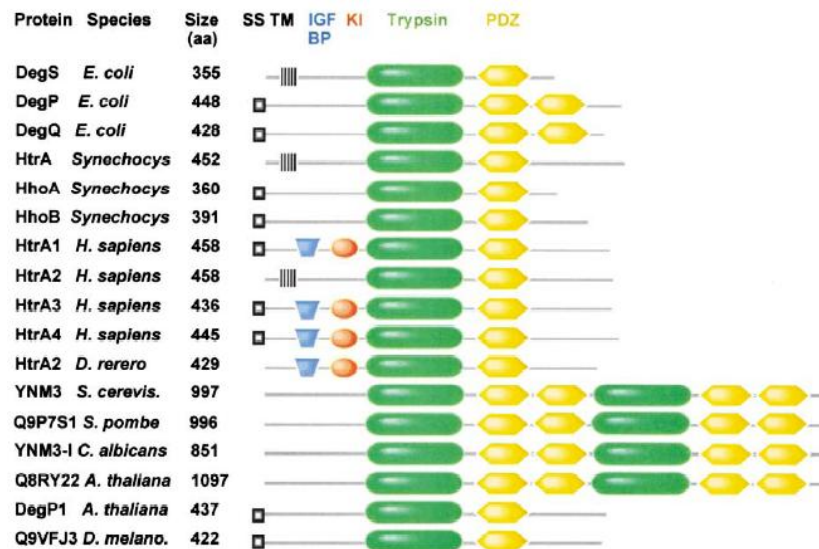


Abb. 1.10: Die Domänenorganisation ausgewählter HtrA-Familienmitglieder

Die Familie der HtrA-Proteasen umfasst sowohl prokaryotische, als auch eukaryotische Mitglieder. N-terminal weisen einige der Mitglieder eine Signal-Sequenz (SS) oder einige Transmembransegmente (TM) auf. Weiterhin sind die relativen Positionen der *insulin growth factor binding domains* (IGFBP, blau), der Kazal-Proteaseinhibitordomänen (KI, rot), der Trypsin-ähnlichen Proteasedomänen (grün) und der PDZ-Domänen (gelb) dargestellt (Clausen, Southan & Ehrmann 2002).

HtrA wurde ursprünglich aufgrund der Phänotypen zweier Nullmutanten in *E. coli* identifiziert. Die Mutanten waren entweder nicht in der Lage bei erhöhter Temperatur zu wachsen oder waren unfähig, fehlgefaltete Proteine im Periplasma zu degradieren. Später konnte gezeigt werden, dass bakterielles HtrA bei niedrigen Temperaturen als molekulares Chaperon fungiert und bei hohen Temperaturen Serinproteaseaktivität zur Degradation fehlgefalteter Proteine besitzt (Spiess, Beil & Ehrmann 1999).

1.9.1 Die humanen HtrAs

Die vier humanen Mitglieder der HtrA-Familie sind HtrA1, HtrA2, HtrA3 und HtrA4. Sie können anhand ihrer Domänenstruktur in zwei Gruppen eingeteilt werden. HtrA2 verfügt über einen Transmembrananker und große Bereiche des N-Terminus können entfernt werden. Die N-Termini von HtrA1, HtrA3 und HtrA4 besitzen eine Signalsequenz, eine IGFBP-Domäne und eine Proteaseinhibitordomäne (Clausen, Southan & Ehrmann 2002). HtrA1, 2

und 3 sind inzwischen gut untersucht und sollen im Folgenden diskutiert werden. HtrA4 hingegen ist kaum charakterisiert.

1.9.2 HtrA1

HtrA1 wurde ursprünglich als in SV40-transfomierten Fibroblasten herunter reguliertes Gen identifiziert (Zumbrunn, Trueb 1996). Die HtrA1-Expression ist außerdem in Ovarialkarzinomen (Shridhar *et al.* 2002), Endometrialkarzinomen (Bowden *et al.* 2006), Melanomen (Baldi *et al.* 2002) und Mesotheliomen (Baldi *et al.* 2008) signifikant herunter reguliert. Die Überexpression von HtrA1 inhibiert die Zellproliferation *in vivo* und *in vitro*. Diese Ergebnisse implizieren eine Tumorsuppressorfunktion für HtrA1. Der Mechanismus, der für die Herunterregulation von HtrA1 in Tumorgewebe verantwortlich ist, ist noch unbekannt.

HtrA1 ist außerdem für Tumorpatienten von Bedeutung, die eine Chemoresistenz ausgebildet haben. Die verminderte HtrA1-Expression in Tumorgewebe kann die chemotherapeutische Cytotoxizität dahingehend modulieren, dass die Sensitivität gegenüber Cisplatin und Paclitaxel attenuiert ist. HtrA1 stellt dementsprechend potentiell einen prognostischen Faktor für den Erfolg einer Chemotherapie in Krebspatienten dar (Chien *et al.* 2006).

HtrA1 ist auch für andere Erkrankungen, wie z.B. für die Pathologie der Arthritis relevant, da es zur Degradation des Knorpels beiträgt. Durch massenspektrometrische Analyse von Synovialflüssigkeit konnte Fibronectin als potentielles HtrA1-Substrat identifiziert werden. Die Behandlung synovialer Fibroblasten mit HtrA1 oder Fibronectin-Abbauprodukten führt zur spezifischen Induktion von MMP1 und MMP3, was eine Beteiligung von HtrA1 bei der Zerstörung der ECM nahelegt (Grau *et al.* 2006). Da HtrA1 verschiedene APP-Fragmente wie A β proteolysieren kann, ist HtrA1 möglicherweise für die Alzheimersche Erkrankung von Bedeutung (Grau *et al.* 2005).

Das Vorhandensein eines *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in der Promotorregion des HtrA1-Gens (rs11200638) geht außerdem mit einem stark erhöhten Risiko, an altersbedingter Makuladegeneration (AMD) zu erkranken (Dewan *et al.* 2006, Yang *et al.* 2006), einher. Das Risikoallel ist mit einer erhöhten mRNA- und Proteinexpression von HtrA1 (Yang *et al.* 2006) assoziiert. Bisher ist noch nicht bekannt, ob dieser SNP auch für andere Erkrankungen relevant ist.

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass HtrA1 am TGF- β -Signalweg beteiligt ist. Das Expressionsprofil von HtrA1 während der murinen Embryonalentwicklung beschränkt sich auf Gewebe, deren Differenzierung stark vom TGF- β -Signalweg abhängig ist. HtrA1 ist

außerdem in der Lage an verschiedene TGF- β -Proteine, wie z.B. Bmp4, Gdf5 oder Activin zu binden und die Signalverarbeitung, vermutlich durch Hemmung der Rezeptoraktivierung, zu inhibieren (Oka *et al.* 2004). Ferner wurden erst kürzlich in genetischen Untersuchungen von Patienten, die an CARASIL (*Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*) leiden, Mutationen des HtrA1-Gens identifiziert, die zur Synthese von Proteinprodukten mit einer geringen Proteaseaktivität, die nicht mehr in der Lage sind die TGF- β -Signalverarbeitung zu inhibieren, führen (Hara *et al.* 2009). Dieses Erkenntnis unterstützt die Vermutung, dass HtrA1 in die TGF- β vermittelte Signalweiterleitung involviert ist.

Während der Schwangerschaft ist die Expression von HtrA1 dynamisch reguliert. Im ersten Trimester ist die Expression sehr niedrig und steigt im dritten Trimester stark an. Das Expressionsmuster von HtrA1 in der humanen Plazenta impliziert, dass die Protease für die Entwicklung und die Funktion der Plazenta von Bedeutung ist. Aufgrund der subzellulären Lokalisation kann außerdem postuliert werden, dass HtrA1 Angriffspunkte, wie z.B. intrazelluläre Wachstumsfaktoren und ECM-Proteine, die die korrekte Bildung und Funktion der Plazenta steuern, hat (De Luca *et al.* 2004).

1.9.3 HtrA2

HtrA2 ist eine mitochondriale Protease und spielt potentiell eine Rolle für die Regulation der Apoptose. HtrA2 wird als Proenzym exprimiert, das in den mitochondrialen Intermembranraum transportiert wird (Hegde *et al.* 2002, Martins 2002). Über einen Transmembrananker heftet sich das HtrA2-Proenzym an die mitochondriale Innenmembran, wo es einen proteolytischen Reifeprozess durchläuft. Das vollständig prozessierte Protein exponiert ein N-terminales *inhibitor of apoptosis binding motif* (IBM). DNA-Schäden, die Aktivierung des *death*-Rezeptors und andere apoptotische Stimuli verursachen die Translokation der reifen Protease in das Cytosol, wo sie über Caspase-abhängige und -unabhängige Mechanismen zur Apoptose beiträgt. Zu den HtrA2-Substraten gehören neben anderen Proteinen, die in die Regulation der Apoptose involviert sind, u.a. das an das IBM gebundene *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) (Suzuki *et al.* 2004, Hegde *et al.* 2002, Martins 2002).

HtrA2 spielt außerdem eine Rolle für neurodegenerative Erkrankungen. Zwei *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) innerhalb des HtrA2-Gens, die jeweils eine *missense*-Mutation verursachen (A141S und G399S) sind mit der Entwicklung der Parkinsonschen Krankheit assoziiert (Strauss *et al.* 2005).

In vitro-Studien haben gezeigt, dass HtrA2 mit Presenilin-1 interagiert und APP spalten kann. Die Ergebnisse müssen *in vivo* genauer untersucht werden, um eine mögliche Beteiligung von HtrA2 in der Alzheimerschen Krankheit zu klären (Gupta *et al.* 2004, Park *et al.* 2006). HtrA2 ist bisher die einzige humane HtrA-Protease, deren Kristallstruktur bekannt ist. Die Protease bildet ein pyramidenförmiges Homotrimer, wobei die Homotrimerisierung ausschließlich durch die Proteasedomänen vermittelt wird. Die Bildung des Trimers ist für die Ausbildung der proteolytischen Funktion von HtrA2 notwendig (Li *et al.* 2002).

1.9.4 HtrA3

HtrA3 weist eine starke Homologie zu HtrA1 auf. Aufgrund der strukturellen Homologie von HtrA3 und HtrA1 wird vermutet, dass beide Proteasen ähnliche Funktion besitzen. Das Expressionsprofil von HtrA3 in embryonalem Mausgewebe ähnelt in den meisten Organen dem von HtrA1 und beschränkt sich auf Gewebe, deren Differenzierung stark vom TGF- β -Signalweg abhängig ist (Oka *et al.* 2004). HtrA3 bindet, ähnlich wie HtrA1, an verschiedene TGF- β -Proteine und inhibiert die Signalverarbeitung von BMP-4, -2 und TGF- β 1. HtrA3 ist wie HtrA1 in der Lage β -Casein und einige ECM-Proteoglycane abzubauen (Tocharus *et al.* 2004). Aufgrund der ähnlichen Expressionsmuster von HtrA1 und HtrA3 in embryonalem Mausgewebe und der Tatsache, dass beide Proteasen in der Lage sind β -Casein und ECM-Proteoglycane abzubauen (Oka *et al.* 2004) wird eine überlappende biologische Funktion der beiden Proteasen in bestimmten Gewebearten postuliert (Tocharus *et al.* 2004).

Die Analyse der Expression von HtrA3 in verschiedenen Geweben hat Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der Protease gegeben. Die HtrA3-Expression ist beispielsweise während der Entwicklung der murinen und humanen Plazenta stark hoch reguliert. Die physiologische Rolle der HtrA3-Expression während der Plazentation ist jedoch noch unbekannt (Nie *et al.* 2006). Neuere Untersuchungen zur Expression von HtrA3 in den Ovarien von Ratten haben gezeigt, dass HtrA3 eine wichtige Rolle bei der Ovarialentwicklung, der Differenzierung der Granulosazellen und der Luteinisation spielt (Bowden *et al.* 2009). Eine sinkende Expression der HtrA3 mRNA-Expression ist bei Fortschreiten von Endometrialkrebs zu beobachten (Bowden *et al.* 2006). Möglicherweise ist die verminderte HtrA3-Expression für die Entstehung von Krebs von Bedeutung.

2 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Mechanismus, der für die Herunterregulation von HtrA1 in Tumorgewebe verantwortlich ist, identifiziert werden. Zunächst sollen dazu Krebszelllinien mit epigenetischen Pharmazeutika, die das globale epigenetische Muster innerhalb der Zelle verändern, behandelt und der Effekt dieser Behandlung auf die HtrA1-Expression hin untersucht werden. Weiterhin soll die HtrA1-Promotorregion hinsichtlich des Vorhandenseins einer *CpG island* und der Bedeutung der DNA-Methylierung für die Genexpressionsregulation analysiert werden. Diese Analysen sollen sowohl mit genomischer DNA aus Krebszelllinien, als auch mit DNA aus den Polypen von APC^{Min/+}-Mäusen durchgeführt werden, um eine mögliche Beteiligung von HtrA1 bei der Entstehung des Kolorektalkarzinoms zu analysieren.

Microarray-Untersuchungen der cDNA aus MBD2^{-/-}-Mäusen, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alan Clarke, Universität Cardiff durchgeführt wurden, haben ergeben, dass die HtrA1-Expression in diesen Mäusen hoch reguliert ist. Demnach ist HtrA1 ein potentielles Ziel von MBD2. Um diese Hypothese zu testen, soll die MBD2-Expression in Krebszelllinien mittels shRNA supprimiert und der Einfluss der MBD2-Suppression auf die HtrA1-Expression untersucht werden.

Außerdem soll analysiert werden, ob rekombinant hergestelltes MBD2b in der Lage ist *in vitro* an DNA zu binden, die einem Ausschnitt des HtrA1-Promotors entspricht. Weiterhin soll getestet werden, ob HtrA1 MBD2 proteolysieren kann.

Ferner soll in Krebszelllinien die Expression von HtrA1 durch viralen Gentransfer wiederhergestellt werden und der Effekt der HtrA1-Rekonstitution auf zelluläre Prozesse wie die Apoptose-Induktion und die Zellmigration untersucht werden. Außerdem soll die subzelluläre Lokalisation von HtrA1 nach Re-Expression bestimmt werden. Mit Hilfe der Zelllinien soll außerdem das tumorigene Potential von HtrA1 *in vivo* untersucht werden, indem die Zellen subkutan in Nacktmäuse injiziert werden und das Tumorstadium beobachtet wird.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Tabelle 3.1: Verwendete Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5α	<i>F</i> -, <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , [Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>], <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , (<i>res</i> -, <i>mod</i> +), <i>deoR</i>	(Hanahan 1983)
One Shot® Chemically Competent <i>E. coli</i>	<i>F</i> - <i>mcrA</i> <i>D(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>f80lacZ</i> Δ <i>M15</i> <i>DlacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> <i>D(ara-leu)</i> 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	(Invitrogen)
BL21 (DE3) Codon Plus	<i>ompT</i> , <i>hsdS(rB-,mB-)</i> , <i>gal(λ</i> <i>clts857</i> , <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7gene1</i>), <i>dcm</i> (<i>D3</i>)	(Studier, Moffatt 1986)

3.1.2 Nährmedien

NZA Medium (1 l)

10 g NZ-Amin

5 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

NZA-Agar

15 g Agar

ad 1 l NZA-Medium

3.1.3 Antibiotika

Tabelle 3.2: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$ Medium]
Ampicillin	100
Chloramphenicol	25
Kanamycin	25

3.1.4 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 3.3: Verwendete eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HCT116	Humane epitheliale Kolorektalkarzinomzelllinie, adhären	(Brattain <i>et al.</i> 1981)
SW480	Humane epitheliale Kolorektalkarzinomzelllinie, adhären	(Leibovitz <i>et al.</i> 1976)
SW620	Humane epitheliale Zelllinie aus der Lymphknotenmetastase eines Kolorektalkarzinoms, adhären	(Leibovitz <i>et al.</i> 1976)
U-373MG	Humane epithel-ähnliche Glioblastom Astrocytom-Zelllinie, adhären	(Ponten, Macintyre 1968)
293T	Adenoviral transformierte humane embryonische Nieren-Epithelzelllinie mit integriertem temperatursensitiven <i>SV40 large T antigen</i> , adhären	(Graham <i>et al.</i> 1977)

3.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Trypsin/EDTA

Fötale Kälberserum (FCS)

Penicillin/Streptomycin (10000 Units/ml PenicillinG, 10000 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycinsulfat)

Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

3.1.6 Puffer und Lösungen

Acrylamid

30% Rotiphorese Gel

10x SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer

333 mM Tris-HCl

1% (w/v) SDS

1,92 M Glycin

SDS-Trenngelpuffer

1,5 mM Tris-HCl, pH 8,8

0,4% (w/v) SDS

SDS-Sammelgelpuffer

0,5 mM Tris-HCl, pH 6,8

0,4% (w/v) SDS

4x SDS-Probenpuffer

0,2 M Tris-HCl, pH 6,8

8% (w/v) SDS

40% (v/v) Glycerin

0,04% (w/v) Bromphenolblau

30 mM DTT

Coomassie-Puffer I

25% (v/v) Isopropanol

10% (v/v) Acetat

0,05% (w/v) Coomassie R250

Coomassie-Puffer II

10% (v/v) Isopropanol

10% (v/v) Acetat

0,005% (w/v) Coomassie R250

Coomassie-Puffer III

10% (v/v) Acetat

0,002% (w/v) Coomassie R250

Dialysepuffer

50 mM NaH_2PO_4 , pH 7,5

pH 8,0

LEW-Puffer

50 mM NaH_2PO_4 , pH 7,5

300 mM NaCl

pH 8,0

Gelfiltrationspuffer

50 mM Tris

5 mM MgCl_2

150 mM NaCl

pH 7,5

Elutionspuffer

50 mM NaH_2PO_4 , pH 7,5

1 M NaCl

250 mM Imidazol

pH 8,0

Reaktionspuffer

50 mM Tris
5 mM MgCl₂
pH 7,5

EMSA-Bindepuffer

50 mM Tris
5 mM MgCl₂
10 mM DTT
pH 7,5

50x TAE-Puffer

50 mM EDTA
2 M Tris-Acetat, pH 8,0

6x DNA-Probenpuffer

30% (v/v) Glycin
0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,025% (w/v) Xylencyanol

ITC-Puffer

50 mM Tris
5 mM MgCl₂
10 mM DTT
5% DMSO
pH 7,5

Alle Puffer und Lösungen werden in Aqua bidest. angesetzt.

3.1.7 Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 3.4: Verwendete Antikörper und Farbstoffe

Bezeichnung	Organismus, Typ	Firma
anti-human HtrA1	Maus, monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden
Ziege anti-Maus IgG	Alexa Fluor® 488	Invitrogen, Karlsruhe
F-Actin	Phalloidin TRITC	Invitrogen, Karlsruhe
Nucleus	DAPI	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.8 Biochemikalien und Chemikalien

3.1.8.1 Chemikalien

Die für die Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

3.1.8.2 Proteine und Enzyme

Tabelle 3.5: Verwendete Proteine und Enzyme

Protein/Enzym	Herkunft
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, München
DNAseI	Sigma-Aldrich, München
Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Phusion High Fidelity Polymerase	Finnzymes, NEB, Ipswich, MA, USA
Restriktionsendonucleasen	NEB, Ipswich, MA, USA

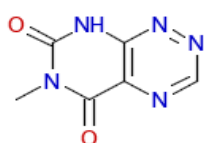
3.1.8.3 Protein- und Nucleinsäurestandards

Tabelle 3.6: Verwendete Protein- und Nucleinsäurestandards

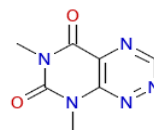
Standard	Herkunft
FPLC Gelfiltration LMW&HMW Standard	Bio-Rad, München
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, München
Prestained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München
Unstained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München
Quick-Load 2-Log DNA Ladder	NEB, Ipswich MA, USA

3.1.8.4 Substanzen aus *Compound-Bibliothek*

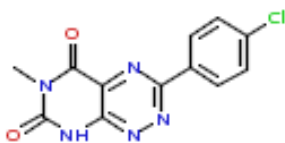
YKS00020



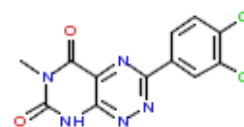
YKS00021



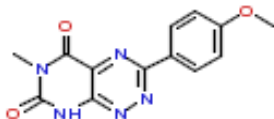
YKS00122



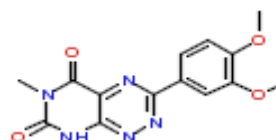
YKS00123



YKS00124



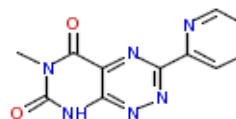
YKS00125



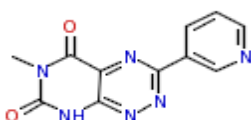
YKS00126



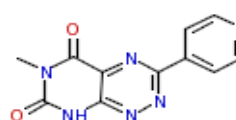
YKS00127



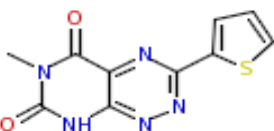
YKS00128



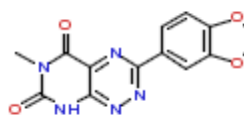
YKS00129



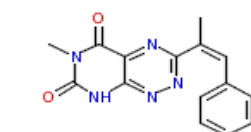
YKS00130



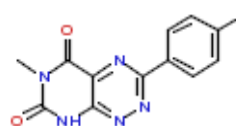
YKS00578



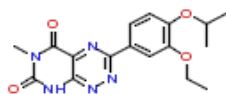
YKS01175



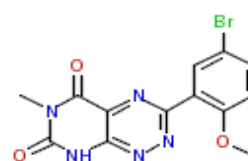
YKS01176



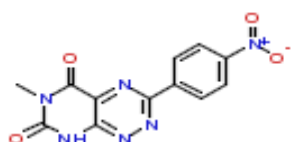
YKS01178



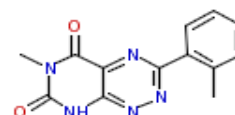
YKS01181



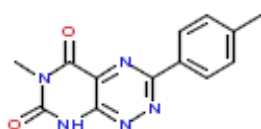
YKS01187



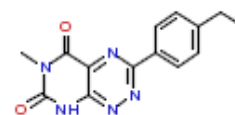
YKS01188



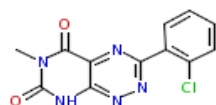
YKS01189



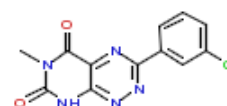
YKS01190



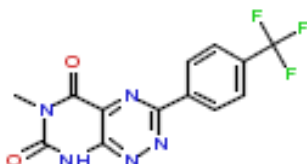
YKS01193



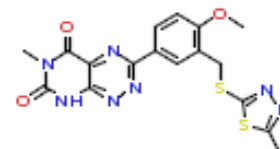
YKS01194



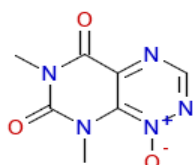
YKS01195



YKS01206



YKS01676



Alle aufgelisteten Substanzen wurden aus der *Compound*-Bibliothek der Firma Vitas-M Laboratory, Moskau, Russland bezogen.

3.1.9 Vektoren und Plasmide

Tabelle 3.7: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung
MP71-iGFP	retroviraler Vektor mit GFP-Insert ¹
p50-MX-neo	retroviraler Vektor ¹
p50 Htr1	retroviraler Vektor mit HtrA1 ²
pCMVΔR8.2	Hilfsvektor gag/pol für Lentiviren ¹
pCR2.1-TOPO	Klonierungsvektor für TOPO TA-Klonierungen ³
pET15_MBD_MBD2b	pET15 mit der MBD von MBD2b ⁶
pET30MeCP2	pET30 mit MeCP2 ⁴
pET28MBD2b	pET28 mit MBD2b ⁵
pHIT60	Hilfsvektor gag/pol für Lentiviren ¹
pHITG	Hilfsvektor VSV-G env zur Pseudotypisierung von Retro- und Lentiviren ¹
pLKO1.puro	lentiviraler Vektor ¹
pLKO1.shMBD2b	lentiviraler Vektor mit shMBD2b ⁶
pLKO1.shMBD2c	lentiviraler Vektor mit shMBD2c ⁶
pLKO1.nonsenseRNA	lentiviraler Vektor mit <i>nonsense RNA</i> ⁶
pRRLU6 CPPT pSK GFP	lentiviraler Vektor mit GFP-Insert ¹

¹ Freundlicherweise von Prof. Stephan Hahn, Zentrum für Klinische Forschung, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt

² Plasmid wurde von Nina Schmidt, Zentrum für Medizinische Biotechnologie, Universität Duisburg-Essen hergestellt.

³ Bestandteil des TOPO TA-Cloning Kits der Firma, Invitrogen, Karlsruhe

⁴ Freundlicherweise von Prof. Alan Clarke, School of Biosciences, Universität von Cardiff, zur Verfügung gestellt

⁵ Freundlicherweise von Prof. Adrian Bird, Wellcome Centre for Cell Biology, Universität von Edinburgh, zur Verfügung gestellt

⁶ Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt

3.1.10 Komplettsysteme

Tabelle 3.8: Verwendete Komplettsysteme

Komplettsystem	Hersteller
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche, Mannheim
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
Nucleobond Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin [®] RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim
TOPO TA Cloning	Invitrogen, Karlsruhe
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIA Spin Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
QPCR SYBR Green Mix	Thermo Scientific, Waltham MA, USA
Verso cDNA Kit	Thermo Scientific, Waltham MA, USA

3.1.11 Oligonucleotide

Alle Oligonucleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) bezogen.

3.1.11.1 Oligonucleotide für QPCR

Tabelle 3.9: Verwendete QPCR-Oligonucleotide

Name	Nucleotidsequenz (5'- 3')
<i>mouse β-Actin forward</i>	GATTACTGCTCTGGCTCCTAG
<i>mouse β-Actin reverse</i>	ACTCATCGTACTCCTGCTTGC
<i>human GAPDH forward</i>	GCTTGTCATCAATGGAAATCCC
<i>human GAPDH reverse</i>	AGCCTTCTCCATGGTGG
<i>human HtrA1 forward</i>	GCAACTCAGACATGGACTACATC
<i>human HtrA1 reverse</i>	GTGTTAATTCCAATCACTTCACCG
<i>mouse HtrA1 forward</i>	GTGCTCTCTGGGGCATATATC
<i>mouse HtrA1 reverse</i>	ATGACATCGCTGACGTCATTG
<i>human MBD1 forward</i>	TCGAGTCAGCTCAACTTTGC
<i>human MBD1 reverse</i>	AAGTCTTTGCAAGTCAGGG

<i>human MBD2 forward</i>	AACCCTGCTGTTTGGCTTAAC
<i>human MBD2 reverse</i>	CGTACTTGCXTGTACTCGCTCTTC
<i>human MeCP2 forward</i>	TTGAGGGGTTTGTCTTGAG
<i>human MeCP2 reverse</i>	CAGCTCCAACAGGATTCCAT
<i>human Rib.-Prot. forward</i>	GGTGGTCGTACGCTGTG
<i>human Rib.-Prot. reverse</i>	GGTCCGCCAGAAGATGC
<i>human PPIA forward</i>	CAAATGCTGGACCCAACACA
<i>human PPIA reverse</i>	CTTGCTGGTCTTGCCATTCC

3.1.11.2 Oligonucleotide für Gelretentionsanalyse (EMSA)

Tabelle 3.10: Verwendete EMSA-Oligonucleotide

Name	Nucleotidsequenz (5'- 3')
<i>HtrA1 Promotor methylated forward</i>	CTCAG5-Methyl-dCGAGAGA
<i>HtrA1 Promotor methylated reverse</i>	TCTCT5-Methyl-dCGCTGAG
<i>HtrA1 Promotor unmethylated forward</i>	CTCAGCGAGAGA
<i>HtrA1 Promotor unmethylated reverse</i>	TCTCTCGCTGAG
<i>EMSA control methylated forward</i>	GTATC5-Methyl-dCGGATAC ⁷
<i>EMSA control methylated reverse</i>	GTATC5-Methyl-dCGGATAC ⁷
<i>EMSA control unmethylated forward</i>	GTATCCGGATAC ⁷
<i>EMSA control unmethylated reverse</i>	GTATCCGGATAC ⁷

3.1.11.3 Oligonucleotide für Bisulfit-Sequenzierungs-PCR (BSP)

Tabelle 3.11: Verwendete Oligonucleotide für Bisulfit-Sequenzierungs-PCR (BSP)

Name	Nucleotidsequenz (5'- 3')
<i>human HtrA1_BSP_259_forward</i>	TGTAGTGYGTGGTGTTTTT
<i>human HtrA1-BSP_259_reverse</i>	AAATTACCCTAACCACCCC
<i>human HtrA1_BSP_-462_forward</i>	GATTTGTAGGAATTTTTTTYGG
<i>human HTRA1 BSP_-462_reverse</i>	ACCCAACCCATTAACCTC
<i>mouse HTRA1_BSP_forward</i>	GAATTTTAGAATGAGAAATTGAGTTAGT
<i>mouse HTRA1_BSP_reverse</i>	CAACAACAATAACAAAAACAAAAAC

⁷ übernommen aus (Ohki et al. 1999)

3.1.11.4 Oligonucleotide für Klonierungen

Tabelle 3.12: Verwendete Oligonucleotide für Klonierungen

Name	Nucleotidsequenz (5'- 3')
<i>pET15 MBD MBD2 forward</i>	GGAATTCCATATGAGCGCGGGGCCGGGG CC
<i>pET 15 MBD MBD2 reverse</i>	CGCGGATCCTAATTTACTAGGCATCATCT TTCCAGTTC
<i>pLKO1.puro shMBD2b forward</i>	CCGGGGAAGTGATCCGAAAATCTTTCTCG AGAAA
<i>pLKO1.puro shMBD2b reverse</i>	AATTAAAAAGGAAGTGATCCGAAAATCTTT CTCGAGAAAGA
<i>pLKO1.puro shMBD2c forward</i>	CCGGGAGCGATGTCTACTACTTCCTCGA GGAAGTAGTAGACATCGCTCTTTTTC
<i>pLKO1.puro shMBD2c reverse</i>	AATTCAAAAAGAGCGATGTCTACTACTTC CTCGAGGAAGTAGTAGACATCGCTC
<i>pLKO1.puro nonsense RNA forward</i>	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTC GAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTG
<i>pLKO1.puro nonsense RNA reverse</i>	AATTCAAAAACAACAAGATGAAGAGCACCC AACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTG

3.1.12 Verbrauchsmaterialien

Dialysemembran ZelluTrans T1	Roth, Karlsruhe
CryoTube Vials	Greiner Bio-One, Frickenhausen
ELISA-Vertiefungsplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
BD Falcon™ Zellkultureinsätze	BD Biosciences, Heidelberg
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Gewebekulturflaschen T25 und T75	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturschale 10 cm und 14,5 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objekträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Protino® Ni-TED 2000	Macherey-Nagel, Düren
SFCA bottle top filters 500 ml, 0,2 µM	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, NY, USA
Sterilfilter 0,45 µM Supor Membran	PALL; East Hills, NY, USA
Vivaspin 15R, 5 kDa-100 kDa	GE Healthcare, München

3.1.13 Geräte

Absaugpumpe Typ N811KN.18	KNF Neuberger, Freiburg
Autoklav	BeliMed, Mühlheim am Inn
Bioruptor	Diagenode, Liège, Belgien
CO ₂ -Inkubator HEPA Class 100	Thermo Scientific, Waltham MA, USA
DNA-Gelelektrophoresekammer	peqlab, Erlangen
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München
FPLC, BioLogic Duo Flow	Bio-Rad, München
Geldokumentation	Intas, Göttingen
Horizontalschüttler	Grant Böckler, Cambridge, GB
Inkubationsschüttler Innova 44	New Brunswick, New Jersey, USA
ITC VP-ITC Calorimeter	Microcal, Wolverton Mill, UK
Konfokales-Mikroskop (TCS-SP5)	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetenrührer RH basic 2	IKA, Staufen
M-100L Microfluidizer Processor	Microfluidics, Newton, USA
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
PAGE-Kammer Mini Trans-Blot Cell	BioRad, München
PCR-Gerät PCR-Gerät Personal	Biometra, Göttingen
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Schott, Mainz
qRT-PCR Gerät Rotor-Gene 3000	Corbett Research, Cambridge, GB
Sicherheitswerkbank HERA safe, HS12	Heraeus, Hanau
Spectrometer Genios Pro	Tecan, Crailsheim
Spektralphotometer Smart Spec Plus	Bio-Rad, München
Standzentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermovac sample degasser	Microcal, Wolverton Mill, UK
Tischzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator Gel Imager	Intas, Göttingen
Waagen	Kern, Balingen-Frommern
Western-Blot Apparaturen	Bio-Rad, München
Zentrifuge: Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge: Optima LE-80K	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Alle nicht aufgeführten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

3.1.14 Software

Acrobate Reader® 8.0	Adobe System Inc, San Jose, USA
BIQAnalyzer	(Bock <i>et al.</i> 2005)
EMBOSS	(Rice, Longden & Bleasby 2000)
ImageJ	rsbweb.nih.gov/ij/index.html
Leica Software	Leica Microsystems, Wetzlar
Office 2007	Microsoft Corporation®, Redmond, USA
Origin7	OriginLab, Northampton, MA, USA
Photoshop® 8	Adobe System Inc, San Jose, USA
PerlPrimer	(Marshall 2004)
RefWorks	RefWorks-COS, Bethesda, USA
RotorGene	Corbett Research, Qiagen, Hilden

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion können DNA-Fragmente von einem DNA-Stück, das als Matrize (*Template*) dient, amplifiziert werden. Für die Reaktion werden zwei Oligonucleotide als *Primer*, die die zu amplifizierende Sequenz flankieren und zu je einem kurzen Abschnitt der beiden DNA-Stränge komplementär sind, und eine hitzestabile DNA-Polymerase, die ausgehend von den *Primern* die Synthese der DNA katalysiert, verwendet. Die Reaktion basiert auf der Trennung des *Templates* durch Hitzedenaturierung (*Denaturing*), gefolgt von der Anlagerung der *Primer* an die Einzelstränge (*Annealing*). In der dritten Phase der Reaktion katalysiert die DNA-Polymerase die Verlängerung der *Primer* durch Anhängen von dNTPs (*Elongation*). Für die Amplifikation eines DNA-Fragments wird dieser dreiphasige Zyklus 30 bis 40-mal wiederholt (Mullis *et al.* 1992).

Der PCR-Ansatz wird folgendermaßen pipettiert:

Tabelle 3.13: Pipettierschema für eine PCR-Reaktion

Volumen [µl]	Komponente
10	5x Phusion Puffer
1	dNTPs (jeweils 10 mM)
2,5	<i>Primer forward</i> (10 µM)
2,5	<i>Primer reverse</i> (10 µM)
0,5	Phusion-Polymerase (5 U/µl)
50-200 ng	<i>Template</i>
ad 50 µl	H ₂ O

Bei jeder PCR-Reaktion wird eine Wasserkontrolle mitgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgt auf einem PCR-Gerät mit folgendem Programm:

1.	98°C	2 min	} 35 Zyklen
2.	98°C	10 s	
3.	55°C-60°C	20 s	
4.	72°C	45 s	
5.	72°C	10 min	

Der Erfolg der PCR-Reaktion wird mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.1.3) überprüft.

3.2.1.2 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen ermöglichen die gezielte Spaltung doppelsträngiger DNA für analytische oder präparative Zwecke. Sie erkennen spezifische palindrome Sequenzen auf der DNA und katalysieren die hydrolytische Spaltung der DNA meist innerhalb der Erkennungssequenz. Die Restriktionsendonucleasen werden entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Nach der Reaktion werden die Reaktionsprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese (3.2.1.3) getrennt und analysiert.

3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe getrennt werden. Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen wandert DNA in einem Spannungsfeld Richtung Anode. Wegen des Molekularsiebeffekts des Agarose-Gels, das ein Polymer aus verschiedenen verknüpften Galactoseeinheiten darstellt, ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA anhängig von Größe und Konformation der Moleküle.

Durch Vergleich mit einer bekannten Menge eines DNA-Längenstandards können Größe und Menge der getrennten DNA-Fragmente abgeschätzt werden. Um die DNA sichtbar zu machen, wird sie mit Ethidiumbromid, einem in die DNA interkalierenden organischen Farbstoff, angefärbt. Der interkalierte Farbstoff kann durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt werden. In diesem Zustand emittiert Ethidiumbromid Licht im orange-roten Wellenlängenbereich (590 nm). In Abhängigkeit von der Größe der eingesetzten DNA werden 1-2% Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf etwa 50 °C und Zufügen von 1,5 µl Ethidiumbromid (1%), wird die Lösung gemischt und in die Gelapparatur gegossen. Das ausgehärtete Gel wird mit 1x-TAE-Puffer überschichtet. Die mit DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Proben und der DNA-Längenstandard werden dann auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 120 V. Das Gel wird anschließend mit dem UV-Transilluminator dokumentiert. Gegebenenfalls werden die gewünschten DNA-Banden mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten, um die DNA für präparative Zwecke aus dem Gel zu isolieren (3.2.1.4).

3.2.1.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Mit Hilfe eines Transilluminators werden die durch Agarose-Gelelektrophorese getrennten DNA-Banden sichtbar gemacht. Die gewünschte Bande kann dann mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten werden. Für die Extraktion der DNA aus dem Gelstück wird das

QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Die Isolierung erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers. Die DNA wird in 20-50 µl ddH₂O eluiert.

3.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA und RNA kann aus der Extinktion der Nucleinsäurelösung bei 260 nm, wo das Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren liegt (OD_{260}), berechnet werden. Das Lösungsmittel der Nucleinsäure dient dabei als Referenz. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA.

Der Quotient aus den Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm kann als Maß für die Qualität der Nucleinsäure herangezogen werden. Der Quotient liegt bei hochwertigen Nucleinsäuren zwischen 1,8 und 2,0.

3.2.1.6 Ligation

Für die Verknüpfung von DNA-Fragmenten wird die T4-DNA-Ligase verwendet. Das Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe und der 5'-Phosphodiestergruppe zweier DNA-Stücke. Diese Reaktion ermöglicht die Integration eines DNA-Fragments in einen Vektor. Die Vektor-DNA und das DNA-Fragment werden in einem molaren Verhältnis von 1:4 eingesetzt, wobei in jedem Reaktionsansatz 100 ng Vektor-DNA eingesetzt werden. Die Reaktion wird entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Um die Reaktionseffizienz zu kontrollieren werden grundsätzlich zwei Kontrollansätze mitgeführt. Ein Kontrollansatz wird ohne *Insert*-DNA durchgeführt, der zweite Ansatz ohne *Insert*-DNA und ohne T4-DNA-Ligase. Die fehlenden Komponenten werden jeweils durch Zugabe des entsprechenden Volumens an ddH₂O ersetzt. Die Reaktions- und Kontrollansätze werden für 5 min bei RT inkubiert und bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt.

3.2.1.7 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Damit Bakterien Plasmid-DNA in ausreichendem Maß aufnehmen können, müssen diese kompetent gemacht werden (Methode modifiziert nach Chung *et al.*, 1989). Dazu werden 5 ml NZA-Medium mit einem Einzelklon beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden 50 ml NZA-Medium mit der Vorkultur beimpft, so dass eine OD_{600} von 0,1 erreicht wird. Die Zellen werden bei 37°C auf einem Schüttler, bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert, damit die Bakterien die log-Wachstumsphase erreichen. Anschließend wird die Kultur für 10-15 min auf Eis abgekühlt. Danach werden die Zellen bei 4°C für 15 min bei

4000 rpm pelletiert. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit 17 ml 10% Glycerin und mit 4 ml 10% Glycerin werden die Zellen zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Transformation gelagert.

3.2.1.8 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Die chemisch kompetenten *E. coli* werden schonend auf Eis aufgetaut. Die Bakterien werden mit 2 µl des Ligationsansatzes (3.2.1.6) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgen der Hitzeschock bei 42°C für 1 min und eine Inkubation für 5 min auf Eis. Anschließend werden 900 µl NZA-Medium zu den Bakterien gegeben, die für 1 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert werden. Diese Inkubationsphase ermöglicht die Regeneration der Bakterien und die Ausbildung der mit dem Plasmid transformierten Antibiotika-Resistenz.

200 µl des Ansatzes werden auf einer Agar-Platte, die das dem Antibiotikaresistenzgen des Plasmids entsprechende Antibiotikum enthält, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.1.9 Direkte Bakterien-Kolonie-PCR

Die Selektion der bei der Transformation (3.2.1.8) erhaltenen positiven Klone erfolgt mit Hilfe einer PCR. Dafür werden von jedem Transformationsansatz Kolonien für die Untersuchung auf das Vorhandensein des korrekten Plasmids ausgewählt. Mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens werden einige Bakterien der Kolonien in 50 µl H₂O überführt und für 10 min auf 95°C erhitzt. Nach einer Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, RT) werden 5 µl des Überstands als *Template* für die PCR-Reaktion verwendet.

Tabelle 3.14: PCR-Ansatz für die direkte Bakterien-Kolonie-PCR

Volumen [µl]	Komponente
1,5	10x Thermo Pol-Puffer
0,3	dNTP (jeweils 10 mM)
0,5	<i>Primer forward</i> (10 µM)
0,5	<i>Primer reverse</i> (10 µM)
0,5	<i>Taq</i> -Polymerase
ad 15 µl	H ₂ O

Die Reaktionsbedingungen werden folgendermaßen gewählt:

1.	94°C	2 min	} 40 Zyklen
2.	94°C	15 s	
3.	55°C	15 s	
4.	72°C	45 s	
5.	72°C	5 min	

Für die Analyse der PCR-Produkte wird je PCR-Ansatz ein Aliquot von 5 µl auf ein Agarose-Gel (3.2.1.3) aufgetragen, um die positiven Klone zu identifizieren, die für die Plasmid-Minipräparation (3.2.1.12) verwendet werden.

3.2.1.10 Herstellung von Glycerindauerkulturen

Um zu einem späteren Zeitpunkt Plasmid-Präparationen von den ausgewählten Bakterienklonen durchführen zu können, werden Glycerin-Dauerkulturen hergestellt.

500 µl der ÜN-Bakterienkultur werden unter sterilen Bedingungen in ein Kryogefäß überführt und mit 500 µl Glycerin (88%) gemischt. Die Glycerindauerkulturen können bei -80°C gelagert und bei Bedarf für das Animpfen von Kulturen verwendet werden. Dazu werden mit Hilfe einer Impföse Bakterien aus dem Kryogefäß entnommen und in Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum überführt.

3.2.1.11 DNA-Sequenzierung

Die hergestellten DNA-Konstrukte werden mit Hilfe der Kapillarsequenzierung auf mögliche Mutationen hin untersucht. Das verwendete Sequenzierungsverfahren beruht auf dem Kettenabbruchverfahren, einem kontrollierten Abbruch der Replikation (Sanger, Nicklen & Coulson 1977). Man benutzt dabei eine DNA-Polymerase, um die Sequenz einer Einzelstrang-DNA zu kopieren. Der Reaktion werden neben dNTPs auch geringe Mengen an fluoreszenzmarkierten ddNTPs hinzugefügt, die aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe zu einem Abbruch der Strangsynthese führen. So entstehen Fragmente verschiedener Länge mit jeweils einem ddNTP am 3'-Ende, die ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Nach Trennung der Fragmente erfolgt die Detektion und Analyse der Syntheseprodukte mit Hilfe eines Laseranregungs-/Detektionssystems anhand der jeweiligen Fluoreszenzmarkierung.

Die Sequenzierung rekombinanter Plasmide wurde bei der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

3.2.1.12 Plasmid-Minipräparation

Nach Identifikation der positiven Klone mit Hilfe der direkten Bakterien-Kolonie-PCR (3.2.1.9) werden Plasmid-Minipräparationen angefertigt. Dafür wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* verwendet. Die Minipräparation erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Konzentration der hergestellten Plasmid-DNA-Lösung wird anschließend photometrisch bestimmt (3.2.1.5).

3.2.1.13 Plasmid-Maxipräparation

Die Plasmid-Maxipräparation erlaubt die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA. Für die Plasmid-Midipräparation werden die Klone verwendet, die in der Sequenzierreaktion (3.2.1.11) als mutationsfrei identifiziert werden konnten. Dazu werden pro Ansatz 100 ml LB-Medium und das dem jeweiligen Plasmid entsprechende Selektionsantibiotikum in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt. Das Medium wird dann mit Hilfe einer Impföse mit Bakterien der entsprechenden Glycerindauerkultur beimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Die ÜN-Kultur wird dann für die Plasmid-Maxipräparation, die mit Hilfe des *NucleoBond Xtra Maxi Kits* durchgeführt wird, verwendet. Die Maxipräparation erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Konzentration der hergestellten Plasmid-DNA-Lösung wird anschließend photometrisch bestimmt (3.2.1.5).

3.2.1.14 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus humanen Zelllinien wurde das *QIAamp DNA Mini Kit* entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

3.2.1.15 Bisulfit-Behandlung von DNA

Für die Untersuchung des Methylierungsstatus von DNA wird die zu untersuchende DNA mit Natriumbisulfit behandelt. Diese Behandlung induziert in einzelsträngiger DNA die hydrolytische Desaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil. Methylierte Cytosine werden durch die Behandlung nicht verändert. Unmethylierte und methylierte DNA unterscheiden sich dementsprechend nach der Bisulfit-Behandlung hinsichtlich ihrer Sequenz (Frommer *et al.* 1992).

Der kritische Schritt für die korrekte Bestimmung des Methylierungsmuster ist die vollständige Konversion der unmethylierten Cytosine. Dafür ist eine Inkubation der DNA bei hohen Bisulfit-Salzkonzentrationen (2,5 – 3 M), hohen Temperaturen (60°C bis 99°C) und einen niedrigen pH-Wert (pH 5) erforderlich. Da die Bisulfit-Behandlung das Vorhandensein von einzelsträngiger DNA erfordert, ist eine vollständige Denaturierung von entscheidender Bedeutung um potentielle Artefakte zu vermeiden.

Nach der Behandlung liegt die DNA als Einzelstrang vor und ist sehr anfällig für Degradation. Dementsprechend wird die Bisulfit-behandelte DNA bei -80°C aufbewahrt und es wird auf wiederholtes Auftauen und Einfrieren verzichtet.

Die Bisulfit-Behandlung erfolgte mit dem *EpiTect Bisulfite Kit* entsprechend den Angaben des Herstellers. In die Reaktion wurden 500 ng bis 2 μg hochqualitative genomische DNA eingesetzt.

3.2.1.16 Bisulfit-Sequenzierungs-PCR (BSP)

Mit Hilfe der PCR und anschließender Sequenzierung kann Bisulfit-behandelte DNA hinsichtlich des Methylierungsmusters untersucht werden. Die PCR auf Bisulfite-behandelter DNA erfordert *Primer*, die Regionen überspannen, in denen kein Cytosin innerhalb eines Dinucleotids CpG vorhanden ist, um eine Amplifikation von methylierter und unmethylierter DNA zu ermöglichen. Weist die zu untersuchende Sequenz eine derart hohe Dichte des Dinucleotids CpG auf, dass es nicht möglich ist, einen ausreichend langen Primer zu gestalten ohne ein CpG zu überspannen, werden *Primer* mit degenerierten Basen verwendet.

Außerdem ist bei der Gestaltung der *Primer* zu beachten, dass alle unmethylierten Cytosine nach der Bisulfit-Behandlung als Uracil vorliegen.

Die PCR-Produkte werden in einen Vektor kloniert (3.2.1.17) und sequenziert (3.2.1.11), um methylierte und unmethylierte Cytosine in der ursprünglichen DNA-Sequenz zu identifizieren. Die Klonierung des PCR-Produkts und anschließende Sequenzierung eines Einzelklons liefert das Methylierungsmuster eines individuellen DNA-Moleküls. In der Sequenz erscheinen unmethylierte Cytosine als Thymin auf dem codierenden Strang und als Adenin auf dem nicht-codierenden Strang.

Für die PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 3.15: PCR-Ansatz für eine BSP

Volumen [μl]	Komponente
5	10xPuffer
1	dNTP (jeweils 10 mM)
2,5	<i>Primer forward</i> (10 μM)
2,5	<i>Primer reverse</i> (10 μM)
0,25	Taq-Polymerase
0,5 – 2 μg	genomische DNA
ad 50 μl	H ₂ O

Für die Amplifikation von Bereichen innerhalb des humanen HtrA1-Promotors wird folgendes PCR-Programm verwendet:

1.	95°C	15 min		
2.	94°C	1 min	}	40 Zyklen
3.	60°C	1 min		
4.	68°C	1 min		
5.	68°C	10 min		

Für die PCR-Reaktion eines Bereichs innerhalb des murinen HtrA1-Promotors werden folgende PCR-Bedingungen gewählt:

1.	95°C	15 min		
2.	94°C	1 min	}	40 Zyklen
3.	55°C	1 min		
4.	72°C	1 min		
5.	72°C	10 min		

Die PCR-Produkte werden dann in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert (3.2.1.17).

3.2.1.17 TOPO TA-Klonierung

Die TOPO TA-Klonierung ist eine hocheffiziente, einstufige Klonierungsstrategie, die das direkte Einbringen eines *Taq*-Polymerase-amplifizierten PCR-Produkts in einen Vektor ermöglicht. Der Vektor pCR2.1-TOPO liegt als linearisierter Vektor mit 3'-Thymidin Überhängen und kovalent gebundener Topoisomerase I vor. Das erlaubt die effiziente Ligation des PCR-Produkts in den Vektor in einer 5-minütigen Reaktion. Das *TOPO TA Cloning-Kit* wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten werden mit sterilen Lösungen und Geräten in der Sterilbank durchgeführt. Die Zelllinien werden bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10% CO₂ im Inkubator kultiviert und in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen-Infektion getestet.

In Tabelle 3.16 sind die Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien beschrieben.

Tabelle 3.16: Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Passage	Verdünnung
HCT116	DMEM, 10 % FCS, 1% Pen./Strep.	alle 2-3 Tage	1:12
SW480	DMEM, 10 % FCS, 1% Pen./Strep.	alle 3-4 Tage	1:7
SW620	DMEM, 10 % FCS, 1% Pen./Strep.	alle 2-3 Tage	1:10
U-373MG	DMEM, 10 % FCS, 1% Pen./Strep	alle 3-4 Tage	1:5
293T	DMEM, 10 % FCS, 1% Pen./Strep	alle 2-3 Tage	1:10

3.2.2.1 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Kryokulturen werden auf Eis transportiert und zügig unter Schwenken im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wird zunächst in 3 ml Medium aufgenommen, um einen osmotischen Schock zu verhindern. Nach etwa 1 min werden weitere 7 ml Medium zugegeben und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (1000 rpm, 5 min, RT). Anschließend wird der Überstand abgesaugt, das Zellsediment in 10 ml Medium resuspendiert und auf eine 10 cm Gewebekulturschale überführt.

Zur Entfernung evtl. abgestorbener Zellen wird nach 24 h das Medium von den Zellen abgesaugt. Die Zellen werden dann mit PBS gewaschen und mit Medium versehen.

3.2.2.2 Passagieren von Zellen

Die kultivierten Zellen werden bei einer Konfluenz von etwa 70-100% passagiert. Dazu werden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen von der Schale erfolgt durch Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA und anschließender Inkubation im Brutschrank. Die Zell-/Trypsinsuspension wird in 7 ml Medium überführt, um das Trypsin zu inaktivieren. Nach Zentrifugation (1000 rpm, 5 min, RT) der Suspension wird der Überstand abgesaugt und das Sediment in 10 ml Medium aufgenommen. Anschließend wird ein Aliquot auf einer Gewebekulturschale ausgesät (Tabelle 3.16).

3.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl pro Volumeneinheit erfolgt mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wird ein Deckgläschen auf der Zählkammer positioniert und ein Tropfen der Zellsuspension unter das Deckgläschen pipettiert. Die Kapillarkräfte sorgen für eine homogene Verteilung der Suspension in der Zählkammer. Die Zellen in den vier äußeren der insgesamt neun großen Quadrate der Zählkammer werden ausgezählt und es wird der Mittelwert gebildet. Da ein Quadrat der Neubauer-Zählkammer einem Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ entspricht, ergibt sich die Zellzahl pro Milliliter aus der Multiplikation des Mittelwerts mit dem Faktor 10^4 .

3.2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Zum Einfrieren werden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA und Inkubation im Brutschrank von der Schale abgelöst und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT). Die sedimentierten Zellen werden in Medium mit 25% FCS und 11% DMSO aufgenommen und jeweils in 1 ml Aliquots in die Kryoröhrchen überführt. Nach schrittweisem Abkühlen der Zellen auf -80°C in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox, werden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.2.5 Gentransfer mit Hilfe viraler Vektorsysteme

Virale Vektoren wurden entwickelt, um ein Zielgen in eine Zelle zu transportieren. Vektorkonstrukte, die sich von Retro- und Lentiviren ableiten, eignen sich insbesondere für die Entwicklung dieser Transportvektoren, da sie stabil in das Genom der infizierten Zelle integrieren. Die Vektoren, die für den Gentransfer benutzt werden, sind replikationsdefizient, d.h. sie sind lediglich in der Lage, einen einzigen viralen Replikationszyklus zu vollziehen. Aufgrund dieses Vektor-Designs können die Virus-Partikel die Zielzelle infizieren, nach reverser Transkription in das Genom der Zelle integrieren und die Expression des Zielgens ermöglichen. Eine weitere Replikation und Ausbreitung auf anderen Zellen ist jedoch nicht möglich. Demnach stellen virale Vektoren ein wertvolles Werkzeug für Gentransferuntersuchungen dar, da sie das stabile Einbringen eines Gens in die Zellen ermöglichen, ohne sie jedoch replizierenden Viren aussetzen zu müssen.

Um einen replikationsdefizienten Vektor herzustellen, werden die gag-, pol- und env-codierenden Bereiche aus dem Genom des Virus entfernt. Dieser Genbereich wird dann durch das Gen, das in die Zelle eingebracht werden soll, ersetzt. Lediglich die Regionen, die für die Erkennung der viralen und zellulären Proteine während der verschiedenen Stufen des viralen Replikationszyklus notwendig sind, verbleiben im Genom.

Um das infektiöse Virus herzustellen, müssen demnach für die Verpackung und enzymatischen Reaktionen notwendigen Komponenten zur Verfügung gestellt werden. Dies wird durch Ko-Transfektion von Hilfsvektoren, die für gag, pol und env codieren, erreicht. In den ko-transfizierten Zellen können dann die Virionen produziert und verpackt werden. Diese Virionen können anschließend für die Transduktion der Zielzellen verwendet werden. Da den Hilfsvektoren die Bereiche zur Rekrutierung der für die Replikation notwendigen Proteine fehlen, werden sie nicht verpackt oder in die Zielzellen transportiert. Demnach findet nur eine Runde der Virusreplikation statt und das in die Zelle einzubringende Gen kann gezielt und kontrolliert transferiert werden.

Um zu verhindern, dass durch Rekombination des viralen Vektors mit den Verpackungskonstrukten ein replikationskompetenter Wildtyp-Virus entsteht, wurde die Strategie des *split genome* entwickelt. Dabei werden das zu transferierende Gen, gag, pol und env von drei separaten Vektoren exprimiert. Dieser *split genome*-Ansatz vermindert die Wahrscheinlichkeit der Bildung eines replikationskompetenten Virus, da er die Anzahl der für die Produktion eines solchen notwendigen Rekombinationsereignisse erhöht.

3.2.2.6 Virale Transduktion

Retroviren und Lentiviren integrieren effizient in das Genom proliferierender Zellen. Der Vorteil von Lentiviren gegenüber Retroviren besteht darin, dass Lentiviren auch in das Genom ruhender Zellen integrieren können. Die 293T-Zellen, dienen als Verpackungszellen für die lentiviralen und retroviralen Konstrukte, mit Hilfe derer die Zielzellen infiziert werden sollen. Für die Transduktion werden $1,5 \times 10^6$ Zielzellen pro 10 cm-Gewebekulturschale ausplattiert und 24 h im Brutschrank inkubiert. Für die Infektion der Zielzellen wird der virushaltige Überstand der transfizierten Verpackungszellen nach etwa 24 h Inkubation im Brutschrank bei 32°C, 5% CO₂ abgenommen, durch Sterilfiltration von Zellresten befreit und nach Zugabe von 10 µl Polybren zu den mit PBS gewaschenen Zielzellen gegeben. Dabei werden pro 10 cm-Gewebekulturschale mit Zielzellen 10 ml virushaltiges Infektionsmedium verwendet. Die Zielzellen werden dann bei 32°C, 5% CO₂ im Inkubator über Nacht inkubiert. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen, wird die Infektion wiederholt. Dazu werden die Verpackungszelllinien weitere 24 h mit Medium versehen und bei 32°C, 5% CO₂ inkubiert, um erneut virushaltiges Medium zu erhalten.

Nach der zweiten Infektion werden die Zielzellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Medium versehen und zwei Tage zur Regeneration bei 37°C, 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Für die Bestimmung der Transduktionseffizienz werden 96 h nach Beginn der zweiten Transduktion die Zellen, die mit dem Kontrollplasmid MP71 (retroviraler Gentransfer) bzw.

pRRLU6 (lentiviraler Gentransfer) transduziert wurden, mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

3.2.2.7 Selektion

Die optimalen Bedingungen für die Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen werden in Vortests ermittelt. Dazu wird mit Hilfe einer Konzentrationsreihe mit Puromycin bzw. Geneticin die Konzentration ermittelt, bei der die Zellen ausgehend von einer Ausgangskonfluenz von 50% innerhalb von 7 Tagen vollständig abgetötet sind. Die optimalen Selektionsbedingungen für die einzelnen Zelllinien sind in Tabelle 3.17 angegeben. Die erfolgreiche Selektion wird anhand der GFP-transduzierten Zellen, die aufgrund der fehlenden Antibiotika-Resistenz sterben, dokumentiert.

Tabelle 3.17: Selektionsbedingungen für transduzierte Zelllinien

Zelllinie	Selektionsantibiotikum	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
HCT116	Geneticin	200
HCT116	Puromycin	1,6
SW480	Puromycin	0,8
SW620	Puromycin	1,2

3.2.2.8 Apoptose-Assay

Der Apoptose-Assay *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* ermöglicht *in vitro* die quantitative Bestimmung der cytoplasmatischen Histone-assoziierten DNA-Fragmente, die infolge des programmierten Zelltods entstehen. Der Assay basiert auf einem quantitativen *Sandwich-Enzym-Immunoassay*-Prinzip, wobei ein monoklonaler Antikörper gegen DNA und Histone verwendet wird. Dies ermöglicht die spezifische Detektion von Mono- und Oligonucleosomen in der cytoplasmatischen Fraktion der Zelllysate. Der Assay wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.2.9 Wundheilungs-Assay

Der Wundheilungs-Assay ist eine einfache Methode um *in vitro* die directionale Migration von Zellen zu untersuchen. Bei dieser Methode wird die *in vivo* Zellmigration während der Wundheilung nachgeahmt, indem eine Wunde in einer konfluenten Zellschicht erzeugt wird. Dann wird beobachtet, wie die Wunde sich schließt.

Für den Wundheilungs-Assay werden HCT116 parental, HCT116 p50 LV und HCT116 p50 HtrA1 Zellen trypsinisiert (3.2.2.2), durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren vereinzelt und gezählt (3.2.2.3). Es werden 6×10^5 Zellen pro Kavität auf einer 24-Kavitäten-Platte ausgesät

und für 48 h im Brutschrank inkubiert. Mit Hilfe einer 10 µl Pipettenspitze wird die Wunde in der Zellschicht erzeugt und fotografiert. Der fotografierte Bereich wird auf der 24-Kavitäten-Platte mit einem Stift markiert. Die Zellen werden im Brutschrank inkubiert, wobei in regelmäßigen Intervallen der gleiche Ausschnitt der Wunde fotografiert wird um das Schließen der Wunde zu dokumentieren. Mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ wird die Größe der Wunde zu den unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt.

3.2.2.10 3D-Migrations-Assay

Das Migrationsverhalten von Zellen wird mit Hilfe eines modifizierten Boyden-Kammer-Systems analysiert (Boyden 1962). Eine Boyden-Kammer besteht aus zwei Kammern, die durch eine poröse Membran voneinander getrennt sind.

Zur Untersuchung der Migration wird eine definierte Anzahl von Zellen auf der Membran ausgesät, die über Nacht durch Inkubation in 10 µg/ml Collagen in PBS mit Collagen beschichtet wurde. Die Zellen werden in Migrationsmedium mit 0,1% FCS für 7 h im Brutschrank inkubiert. Um die zufällige Migration der Zellen zu bestimmen, wird in die untere Kammer Migrationsmedium gegeben. Um Effekte auf die Chemotaxis der Zellen zu untersuchen, wird die untere Kammer mit Vollmedium (10% FCS) befüllt. Nicht-migrierte Zellen werden mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens von der Oberseite der Membran entfernt. Die Anzahl der durch die Membran migrierten Zellen wird durch DAPI-Färbung (1µg/ml DAPI in PBS mit 0,1% Triton X-100, Inkubation für 10 min) und fluoreszenzmikroskopische Auswertung bestimmt.

3.2.2.11 Immuncytochemischer Nachweis von Proteinen in Zellen

Für die Herstellung von Präparaten für die mikroskopische Analyse von Zellen werden diese auf sterilen Objektträgern ausgesät. Dazu wird unter sterilen Bedingungen ein Objektträger in eine 14,5 cm-Gewebekulturschale überführt. Die Zellen werden ausgesät und mindestens 1 bis 2 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen vollständig adhären sind. Nach Entfernen des Mediums werden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und durch Inkubation für 10 min in PBS mit 4% Formaldehyd fixiert. Nach Waschen mit PBS werden die Zellen zur Permeabilisierung für 10 min mit 0,1% Triton-X 100 in PBS inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Um die unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, werden die Zellen für 30 min mit 1% BSA in PBS inkubiert. Dann werden 200 µl der Erstantikörperlösung auf den Objektträger pipettiert und für 30 min inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS werden 200 µl Zweitantikörperlösung, die gegebenenfalls auch Farbstoffe zur Färbung des Nucleus und des Actins enthält, auf den

Objektträger pipettiert und für 30 min inkubiert. In Tabelle 3.18 sind die Verdünnungen der verwendeten Antikörper und Farbstoffe angegeben.

Tabelle 3.18: Verdünnungen der für die Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper und Farbstoffe

Antikörper/Farbstoff	Verdünnung	Art
α -HtrA1	1:1000	primärer Antikörper
α -Maus Alexa 488	1:300	sekundärer Antikörper
Phalloidin-TRITC	1:300	Farbstoff (Actin)
DAPI	1:10000	Farbstoff (Nucleus)

Anschließend werden die Zellen einmal mit PBS und einmal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wird ein Tropfen *ProLong Gold Antifade* auf den Objektträger gegeben und ein Deckglas möglichst luftblasenfrei darauf platziert. Zum Trocknen werden die Präparate 48 h bei RT unter Lichtausschluss aufbewahrt, bevor sie bei 4°C langfristig gelagert werden können. Die Präparate werden mit Hilfe eines Konfokal-Mikroskops (Leica TCS-SP5) analysiert.

3.2.2.12 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (LSCM, *Laser Scanning Confocal Microscopy*) zeichnet sich gegenüber der Durchlicht- und der Epifluoreszenzmikroskopie durch eine deutlich erhöhte optische Auflösung aus.

Letztere ist in der optischen Auflösung dadurch limitiert, dass sie das Objektfeld als ganzes ausleuchtet und damit zur Unschärfe beitragende Bildinformationen von oberhalb und unterhalb der Fokusebene in die Abbildung integriert. Die LSCM zeichnet sich dadurch aus, dass mit Hilfe von Blenden und Spiegeln das Licht auf einen punktförmigen Bereich der Probe fokussiert wird.

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten konfokalen Mikroskop (TCS.SP5, Leica) stehen bis zu sechs verschiedene Kanäle zur Verfügung, mit Hilfe derer mehrere Fluoreszenzsignale im identischen Präparat simultan oder sequentiell abgerastert und anschließend digital zu einem Bild rekonstruiert werden können. Als Lichtquelle werden Laser verwendet (Diodenlaser, Argon-Laser, Helium-Neon-Mischgaslaser), die sich aufgrund seines linienförmigen Spektrums besonders zur Bereitstellung einer für ein gegebenes Fluorophor benötigten Anregungswellenlänge eignen.

3.2.2.13 Quantitative Real-Time PCR (QPCR)

Die Reverse Transkription, gefolgt von einer PCR-Reaktion, ist die Methode der Wahl zur Analyse der mRNA-Expression. Diese Methode, die als QPCR bezeichnet wird, ist hochsensitiv und erlaubt auch die Quantifizierung von sehr geringen Transkriptmengen und sehr kleinen Veränderungen der Genexpression.

Die einfachste Detektionsmethode für das neusynthetisierte PCR-Produkt in der QPCR basiert auf der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR Green I* in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA. Nach jedem Amplifikationszyklus der QPCR kann so anhand der Fluoreszenz die Amplifikationsmenge bestimmt werden. Für die Quantifizierung der Expression des Zielgens wird die Methode der relativen Quantifizierung gewählt. Dabei wird die Expression des Zielgens relativ zur Expression von Referenzgenen ermittelt (Pfaffl, Horgan & Dempfle 2002). Als Referenzgene dienen nicht-regulierte Gene, sogenannte *Housekeeping genes*, deren mRNA-Synthese idealerweise in verschiedenen Geweben stabil und unabhängig von experimentellen Behandlungen ist. Die relative Berechnung der Expression des Zielgens im Vergleich zu einem Referenzgen kompensiert Unterschiede in Qualität und Quantität der cDNA-Proben innerhalb eines Ansatzes. Mögliche Variationen der Genexpression aufgrund der experimentellen Bedingungen, die Ziel- und Referenzgen in gleichem Maße beeinflussen, können ebenfalls ausgeglichen werden.

Der Prozess der Normalisierung berücksichtigt die unterschiedlichen Effizienzen der PCR-Amplifikationen von Zielgen (E_{Ziel}) und Referenzgen (E_{Referenz}) und transformiert die logarithmischen Rohdaten in lineare Einheiten, welche die normalisierte Expression angeben.

Die C(T)-Werte der Proben werden mit Hilfe des Programms RotorGene bestimmt. Dafür wird die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzkurven ausgewählt, die durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz der Zyklen zwei bis zehn subtrahiert und der Schwellenwert der Fluoreszenz auf 0,025 gesetzt. Der C(T)-Wert gibt den Zyklus an, an dem die Fluoreszenz in der Probe den Schwellenwert erreicht, wobei umso weniger Zyklen zum Erreichen des Schwellenwerts benötigt werden, je mehr Template-cDNA in der Probe am Anfang der QPCR-Reaktion vorhanden ist.

Die Auswertung der Rohdaten erfolgt mit Hilfe der *Software Q-Gene*. Zunächst wird die normalisierte Expression (NE) einer Serie mit n Wiederholungen mit Hilfe der Formel 3.1 durch n paarweise Vergleiche von CT_{Referenz} mit einem CT_{Ziel} derselben Serie berechnet.

Formel 3.1

$$NE = \frac{(E_{Referenz})^{CT_{Referenz}}}{(E_{Ziel})^{CT_{Ziel}}}$$

Dann werden die Mittelwerte und die Standardfehler für die Referenz und das Zielgen berechnet und die mittlere normalisierte Expression (MNE) über folgende Gleichung ermittelt:

Formel 3.2

$$MNE = \frac{E_{Referenz}^{CT_{Referenz, Mittelwert}}}{E_{Ziel}^{CT_{Ziel, Mittelwert}}}$$

Der Standardfehler der mittleren normalisierten Expression (SF_{MNE}) wird schließlich mit Hilfe der Gauss'schen Fehlerfortpflanzung berechnet:

Formel 3.3

$$SE_{MNE} = MNE \cdot ((\ln(E_{Ziel}) \cdot SE_{CT_{Ziel, Mittelwert}})^2 + (\ln(E_{Referenz}) \cdot SE_{CT_{Referenz, Mittelwert}})^2)^{\frac{1}{2}}$$

Mit Hilfe dieser Berechnungen können die Rohdaten der QPCR evaluiert und statistisch analysiert werden. Im Folgenden werden die Methoden zur Vorbereitung und die Durchführung der QPCR-Reaktion beschrieben.

3.2.2.14 RNA-Isolierung aus Zellen

Die RNA aus Zellen wird mit Hilfe des *NucleoSpin RNA II Kits* durchgeführt. Für die Isolierung werden die Zellen einer 6 cm-Schale mit einer Konfluenz von 90% verwendet. Die Präparation erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers.

Die Konzentration der RNA-Lösung wird photometrisch bestimmt. Die isolierte RNA wird bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2.15 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die photometrische Bestimmung der Konzentration von RNA-Lösungen erfolgt prinzipiell wie die Konzentrationsbestimmung von DNA. Die RNA-Lösungen werden jedoch vor der photometrischen Analyse für 5 min bei 65°C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen und eine homogene Verteilung der RNA-Moleküle im Lösungsmittel zu gewährleisten. Die Proben werden dann in geeigneter Verdünnung gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht

bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm einer Konzentration von 40 µg/µl einzelsträngiger RNA.

3.2.2.16 cDNA-Synthese

Die RNA wird für die Synthese von cDNA verwendet. Diese wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase und einem Oligo-(dT)-*Primer*, der komplementär zum Poly-A-Ende der mRNA ist und eine spezifische reverse Transkription der mRNA ermöglicht, durchgeführt.

Die cDNA-Synthese wird mit Hilfe des *Verso cDNA Kits* entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wird parallel eine Kontrolle (Minus-RT-Kontrolle) mitgeführt, die keine Reverse Transkriptase enthält.

3.2.2.17 Design von QPCR-Primern

Die *Primer*, die für QPCR-Reaktionen eingesetzt werden, werden mit Hilfe des Programms *Perl Primer* entworfen. Wenn möglich werden dabei folgende Bedingungen gewählt:

- T_m der *Primer* zwischen 58°C und 60°C
- Maximal 2°C Temperaturdifferenz zwischen den T_m des *sense*- und *antisense*-*Primers*
- G/C-Gehalt zwischen 40% und 60%
- *Primer*-Länge zwischen 19 und 21 nt
- T_m des Amplicons zwischen 78°C und 87°C
- Länge des Amplicons zwischen 90 und 200 bp
- *Primer* sollen möglichst weit am 3'-Ende liegen und möglichst einen Exon-Intron-Übergang überspannen

Die *Primer*-Paare werden mit Hilfe des Programms außerdem auf die Möglichkeit intra- und intermolekulare Sekundärstrukturen zu bilden, untersucht. Das *Primer*-Paar, das die geringste Neigung zur Sekundärstrukturbildung zeigt, wird durch Datenbanksuche (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) auf Spezifität hinsichtlich des Zielgens untersucht.

3.2.2.18 Bestimmung der *Primer*-Effizienz

Die Effizienz der entworfenen *Primer* wird mit Hilfe eines Pools aus den hergestellten cDNA-Proben bestimmt. Die Proben werden nach folgendem Schema verdünnt:

Tabelle 3.19: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der *Primer*-Effizienz

22 µl 1:2 Verdünnung	mit 88 µl H ₂ O verdünnt	1:10 Verdünnung
44 µl 1:10 Verdünnung	mit 44 µl H ₂ O verdünnt	1:20 Verdünnung
22 µl 1:20 Verdünnung	mit 88 µl H ₂ O verdünnt	1:100 Verdünnung
43 µl 1:100 Verdünnung	mit 43 µl H ₂ O verdünnt	1:200 Verdünnung
20 µl 1:200 Verdünnung	mit 80 µl H ₂ O verdünnt	1:1000 Verdünnung
33 µl 1:1000 Verdünnung	mit 33 µl H ₂ O verdünnt	1:2000 Verdünnung

Diese Verdünnung werden jeweils in Dreifachbestimmung unter Verwendung der zu untersuchenden *Primer* in die Reaktion eingesetzt. Die Reaktion erfolgt wie in 3.2.2.19 beschrieben.

Für die Auswertung wird das Computerprogramm Microsoft Excel verwendet. Mit Hilfe des Programms werden in einem Diagramm der Logarithmus der Konzentration auf der Abszisse und die C(T)-Werte auf der Ordinate aufgetragen. Die Steigung m der resultierenden Gerade wird über lineare Regression bestimmt. Mit Hilfe der Steigung m kann dann die Amplifikationseffizienz E mit Hilfe folgender Formel berechnet werden:

Formel 3.4

$$E = 10^{\frac{-1}{m}}$$

Für die QPCR werden nur solche *Primer* verwendet, deren Effizienz bei mindestens 1,8 liegt.

3.2.2.19 QPCR-Reaktion

Jede QPCR-Messung wird in Dreifachbestimmung durchgeführt. Außerdem wird für jedes Primerpaar eine Wasserkontrolle mitgeführt. Die Ansätze der QPCR werden nach folgendem Schema hergestellt:

Tabelle 3.20: Pipettierschema für die QPCR

Volumen [µl]	Komponente
12,5	<i>SYBR Green Mix</i>
1	<i>Primer forward</i> (10 µM)
1	<i>Primer reverse</i> (10 µM)
4	cDNA (5 ng/µl)
ad 20	H ₂ O

Die QPCR-Reaktion erfolgte am Rotor Gene3000 mit folgendem PCR-Programm:

1.	95°C	15 min		
2.	95°C	15 s	}	40 Zyklen
3.	56°C	30 s		
4.	72°C	30 s		
5.	40°C	120 s		
6.	50°C	60 s		
7.	50-99°C	je 1°C, 5 s		Schmelzkurve

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts wird die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Die Methode basiert auf der Bindung von SDS, einem anionischen Detergenz, an die Proteine, wobei die Ladung des SDS die Eigenladung von Proteinen effektiv maskiert. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld ist dann proportional zur Masse. Die Proteine werden vor der Auftrennung im Gel auf 95°C erhitzt und in DTT-haltigem SDS-Ladepuffer gelöst, was zur Spaltung der Disulfidbrücken und zur Auflösung von Sekundär- und Tertiärstrukturen führt. Die Proteinmoleküle liegen dann in Form des Zufallsknäuels vor, so dass ihre Größe proportional zur Masse ist und die Trennung der Proteine umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts erfolgt.

Trenngel und Sammelgel werden nacheinander gegossen. Das Trenngel wird zwischen zwei Glasplatten, die durch zwei Abstandshalter am Rand voneinander getrennt sind, gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um die Ausbildung eines Meniskus zu verhindern und Luftausschluss zu gewährleisten. Nach Aushärten des Gels wird das Trenngel gegossen, wobei ein Kunststoffkamm in das Sammelgel eingeführt wird, um die Probenaschen zu modellieren. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wird das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, die anschließend mit SDS-Laufpuffer gefüllt wird.

Die Proteinproben mit 4x SDS-Laufpuffer versetzt und durch Inkubation für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben und ein Größenstandard werden auf das Gel aufgetragen.

Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgt zunächst bei 80 V, nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hat, bei 150 V.

3.2.3.2 Coomassie Blau-Färbung

Coomassie-Blau ermöglicht die unspezifische Anfärbung von Proteinen nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Polyacrylamidgel. Der Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an.

Für die Färbung wird das Polyacrylamidgel 1 min in Puffer A in der Mikrowelle erhitzt (400 W) und 5 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Das Gel wird jeweils 1 min in Puffer A, Puffer B und Puffer C in der Mikrowelle (400 W) erhitzt. Die Entfärbung erfolgt durch Inkubation in Puffer D für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

3.2.3.3 Reinigung von Protein mit His-Tag

Anzucht des Überexpressionsstamms BL21 D3 Codon Plus

Zunächst wird eine Vorkultur angesetzt, indem 5 ml NZA-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und für 8 h bei 37°C auf dem Rundschüttler inkubiert. Diese Vorkultur wird für das Ansetzen einer 200 ml Kultur, verwendet, die über Nacht bei 37°C, 180 rpm inkubiert wird. Am nächsten Tag werden 4 l NZA-Medium mit Hilfe der ÜN Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,7 bei 37°C, 180 rpm inkubiert. Die Kultur wird mit 1 mM IPTG induziert und 4 h bei 28°C, 180 rpm inkubiert. Die Bakterien werden durch Zentrifugation (6000 g, 4°C, 15 min) sedimentiert und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Präparativer Aufschluss von Bakterienzellen

Die sedimentierten Bakterien werden langsam auf Eis aufgetaut und kaltem Lysepuffer resuspendiert. Der Aufschluss erfolgt am Mikrofluidizer M-110L bei einem Druck von 12 bar.

Reinigung von MBD2 über Ni-TED

Nach dem Zellaufschluss werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (20.000 rpm, 30 min, 4°C) sedimentiert. Das Pellet wird in Lysepuffer resuspendiert und auf die mit Lysepuffer äquilibrierte Ni-TED-Säule aufgetragen. Die Säule tropft durch die Schwerkraft. Nichtbindende Proteine sollen durch zweimaliges Waschen mit 4 ml Lysepuffer, zweimaliges Waschen mit 4 ml Waschpuffer und Waschen mit 4 ml Lysepuffer entfernt werden. Die Elution erfolgt in drei Schritten mit jeweils 3 ml Elutionspuffer.

Die einzelnen Fraktionen werden durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung hinsichtlich des Vorhandenseins des zu reinigen Proteins und des Reinheitsgrades untersucht.

3.2.3.4 Gelfiltration

Die multimere Organisation von Proteinen kann mit Hilfe der Gelfiltration bestimmt werden. Dafür wird eine Superdex200 HR 10/30-Säule verwendet, die mit Gelfiltrationspuffer äquilibriert wurde. Die Flussrate beträgt 0,5 ml/min und das Auftragsvolumen der Proben liegt zwischen 250 µl und 500 µl. Das zu analysierende Protein wird in Konzentrationen zwischen 1,0 und 1,33 mg/ml eingesetzt. Die Durchführung der Gelfiltration wird bei 4°C durchgeführt. Die Kalibrierung der Säule erfolgt nach Anleitung des Gelfiltrationskalibrierungskits *LMW & HMW*.

3.2.3.5 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Zur Analyse von DNA-Protein-Interaktionen wird eine Gelretentionsanalyse, auch *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) genannt, durchgeführt. Dazu werden kurze doppelsträngige DNA-Moleküle hergestellt. Die einzelsträngigen Oligonucleotide werden in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt, für 10 min auf 95°C erhitzt und um 1°C pro Minute langsam auf RT abgekühlt.

Die DNA wird in einem molaren Verhältnis von 1:1 mit dem zu untersuchenden Protein in EMSA-Bindepuffer gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Proben werden dann auf ein 12% TBE-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe einer Ethidiumbromidfärbung können die DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Anhand der Position der Banden kann überprüft werden, ob die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente durch Bindung an das Protein beeinflusst wird.

3.2.3.6 Abbau von Proteinen durch HtrA1

Um zu untersuchen, ob bestimmte Proteine Substrate von HtrA1 sind, werden diese mit verschiedenen Konzentrationen von HtrA1 inkubiert. Durch SDS-PAGE (3.2.3.1) und Coomassie-Blau Färbung (3.2.3.2) kann dann untersucht werden, ob HtrA1 das Protein abbaut.

5 µg des zu untersuchenden Proteins werden mit verschiedenen HtrA1-Mengen in EMSA-Bindepuffer gemischt und bei 37°C für 1 h und 3 h inkubiert. Die Proben werden dann mit SDS-Ladepuffer gemischt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung untersucht.

3.2.3.7 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Zur Bestimmung thermodynamischer Charakteristika der Bindung zwischen MBD2 und einer Substanz wurde die Isothermale Titrations Kalorimetrie (ITC) durchgeführt. Bei der ITC wird der Ligand kontinuierlich zu dem Protein titriert. Gleichzeitig wird die Wärmeentwicklung

gemessen. Anhand dieser Größe können Enthalpie, Entropie und Dissoziationskonstante der Bindung bestimmt werden.

In dieser Arbeit wird ein VP-ITC Mikrokalorimeter verwendet. Das Protein und die zu analysierende Substanz werden für die Messungen im identischen Puffer gelöst und für 15 min entgast. Es wurden 1,4 ml Protein- und 0,3 ml Peptidlösung eingesetzt. Die Reaktionstemperatur beträgt 37°C. Jeweils 5 µl Substanz wurden in 7,1 s zu dem Protein titriert, wobei eine Äquilibrierungszeit von 240 s und eine Rührgeschwindigkeit von 394 rpm gewählt werden. Zur Erstellung einer Referenzkurve wird die Peptidlösung zu dem Puffer ohne Protein titriert. Die Daten werden anschließend mit Hilfe *Software Origin* ausgewertet, wobei die Referenzkurve für die Korrektur der Messung verwendet wird.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis einer CpG island im Bereich des HtrA1-Promotors

Die HtrA1-Expression ist in verschiedenen Tumorgeweben herunter reguliert (Shridhar *et al.* 2002, Bowden *et al.* 2006, Baldi *et al.* 2002, Baldi *et al.* 2008, Nie *et al.* 2003). Der Mechanismus, der für die verminderte HtrA1-Expression verantwortlich ist, ist jedoch noch unbekannt. Um zu untersuchen, ob die DNA-Methylierung als potentieller Mechanismus für die HtrA1-Genexpressionsregulation in Frage kommt, wurde die HtrA1-Promotorregion hinsichtlich des Vorhandenseins einer *CpG island* untersucht. Dafür wurde das Computerprogramm CpGPlot/CpGReport verwendet. Das Programm berechnet das Verhältnis der in einer Nucleotidsequenz vorhandenen Anzahl von CpG-Dinucleotiden zu der Anzahl der erwarteten CpG-Dinucleotide über ein Fenster von 100 bp, das entlang der zu analysierenden Sequenz bewegt wird. Eine *CpG island* ist standardmäßig definiert als eine Region, in der die für die Sequenz berechnete Summe aus Prozent G und Prozent C über 50% liegt und die Ratio von vorhandenen CpG-Stellen zu erwarteten CpG-Stellen größer als 0,6 ist (Gardiner-Garden, Frommer 1987). Regionen, die diese Kriterien erfüllen, werden von dem Programm als *CpG island* ausgegeben.

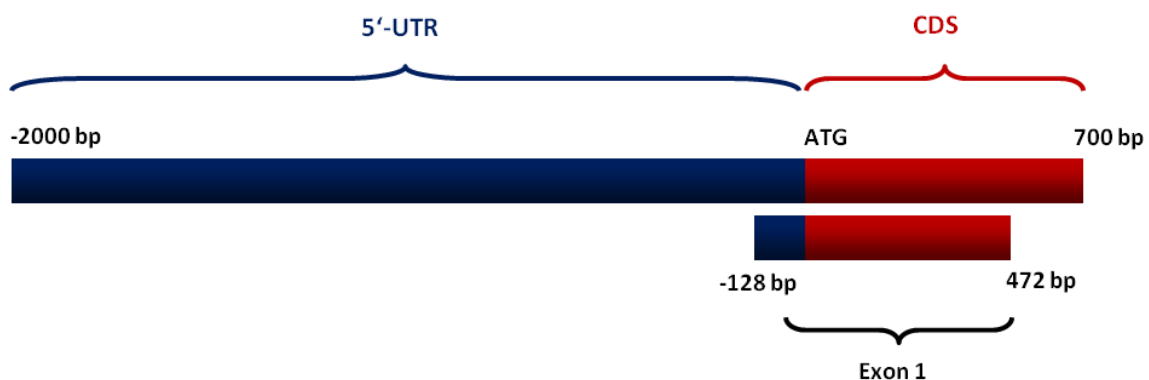
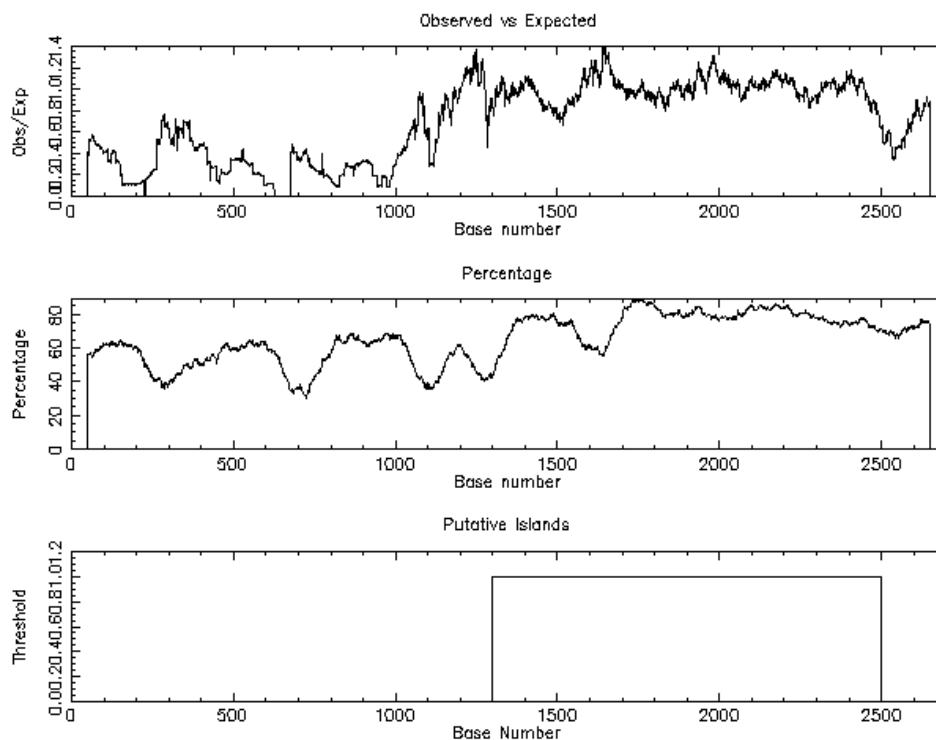


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der humanen HtrA1-Promotorregion

Mit Hilfe des Programms CpGPlot/CpGReport wurde der Bereich zwischen -2000 bp und 700 bp analysiert. Das Exon 1 erstreckt sich von -128 bp bis 472 bp.

Für die *in silico*-Untersuchung der Promotorregion des humanen HtrA1-Gens wurde der Bereich zwischen -2000 bp bis 700 bp ausgewählt (Abb. 4.1) und in das Programm CpGPlot/CpGReport eingegeben. Das Ergebnis der Analyse der CpG-Stellen innerhalb der Sequenz ist in Abb. 4.2 dargestellt.



CPGPLOT islands of unusual CG composition
EMBOSS_001 from 1 to 2700

```
Observed/Expected ratio > 0.60
Percent C + Percent G > 50.00
Length > 200
```

Length 1203 (1300..2502)

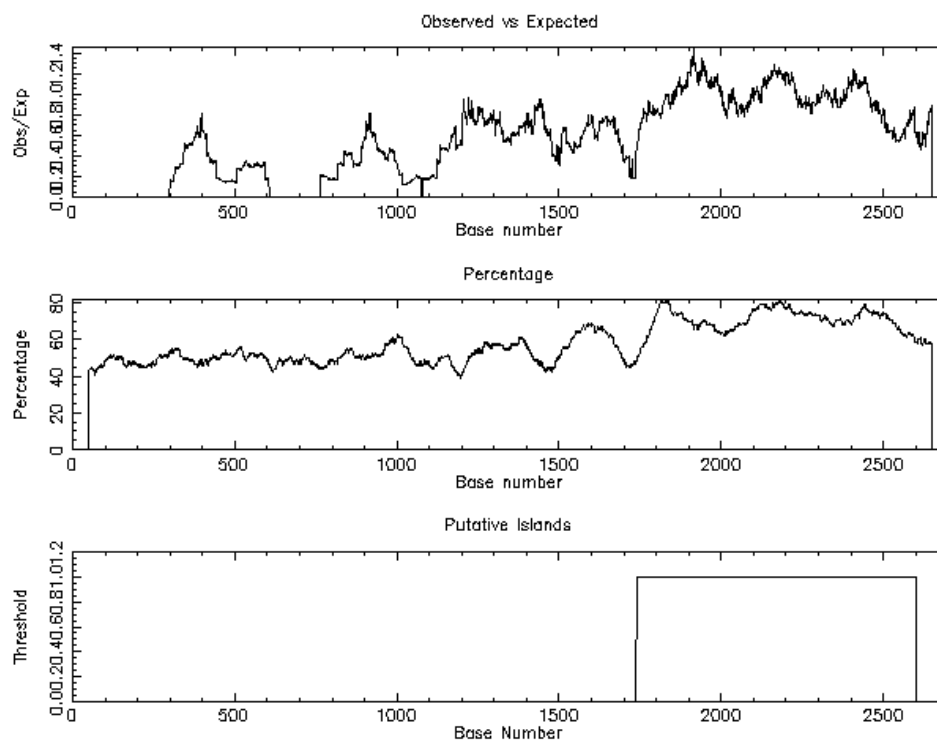
Abb. 4.2: Ergebnis der Untersuchung der humanen HtrA1-Promotorregion hinsichtlich des Vorhandenseins einer CpG island

Bei der untersuchten Region handelt es sich um den Bereich von -2000 bp bis 700 bp des HtrA1-Gens. Das oberste Diagramm gibt die errechnete Ratio aus der Anzahl der vorhandenen CpGs und der Anzahl der erwarteten CpGs an. Das mittlere Diagramm gibt die Summe aus dem prozentualen C-Anteil und dem G-Anteil in der Sequenz an. Im unteren Diagramm ist die Lokalisation der putativen CpG island angegeben.

Die Analyse zeigt, dass der humane HtrA1-Promotor eine sehr hohe CpG-Dichte aufweist. Insbesondere im Bereich zwischen -700 bp und 500 bp ist die Summe aus dem prozentualen C-Anteil und dem prozentualen G-Anteil mit 60% bis 85% sehr hoch. Zwischen -2000 bp und -500 bp liegt dieser Wert zwischen 30% und 60%. Ab -1000 bp steigt die Ratio von vorhandenen CpGs zu erwarteten CpGs auf über 0,6 an und sinkt bei 500 bp wieder ab.

Dieser Abschnitt erfüllt die Kriterien einer *CpG island* und wird von dem Programm als solche identifiziert. Demzufolge ist innerhalb der HtrA1-Promotorregion eine *CpG island* lokalisiert, die sich über den Bereich von -700 bp bis 502 bp erstreckt.

Der murine HtrA1-Promotor wurde ebenfalls im Bereich zwischen -2000 bp bis 700 bp hinsichtlich des Vorhandenseins einer *CpG island* untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 4.3 dargestellt.



```
CPGPLOT islands of unusual CG composition
EMBOSS_001 from 1 to 2700
```

```
Observed/Expected ratio > 0.60
Percent C + Percent G > 50.00
Length > 200
```

```
Length 865 (1740..2604)
```

Abb. 4.3: Ergebnis der Untersuchung der murinen HtrA1-Promotorregion hinsichtlich des Vorhandenseins einer *CpG island*

Bei der untersuchten Region handelt es sich um den Bereich von -2000 bp bis 700 bp des HtrA1-Gens. Das oberste Diagramm gibt die errechnete Ratio aus der Anzahl der vorhandenen CpGs und der Anzahl der erwarteten CpGs an. Das mittlere Diagramm gibt die Summe aus dem prozentualen C-Anteil und dem G-Anteil in der Sequenz an. Im unteren Diagramm ist die Lokalisation der putativen *CpG island* angegeben.

Der murine HtrA1-Promotor weist, wie der humane HtrA1-Promotor, eine sehr hohe CpG-Dichte auf. Insbesondere zwischen -300 bp und 600 bp liegt der prozentuale C-Anteil und G-Anteil über 60%. Da außerdem die Ratio aus vorhandenen CpGs zu erwarteten CpGs in

diesem Bereich größer als 0,6 ist, identifiziert das Programm eine 865 bp lange *CpG island*, die sich von -260 bp bis 604 bp erstreckt.

4.2 Vergleich der HtrA1-Genexpression in verschiedenen humanen Zelllinien

Um die Expression von HtrA1 in verschiedenen Krebszelllinien zu untersuchen, wurde RNA isoliert (3.2.2.14), in cDNA umgeschrieben (3.2.2.16) und eine QPCR (3.2.2.19) zur relativen Quantifizierung der HtrA1-Expression durchgeführt. In Abb. 4.4 ist das Ergebnis der QPCR-Analyse dargestellt.

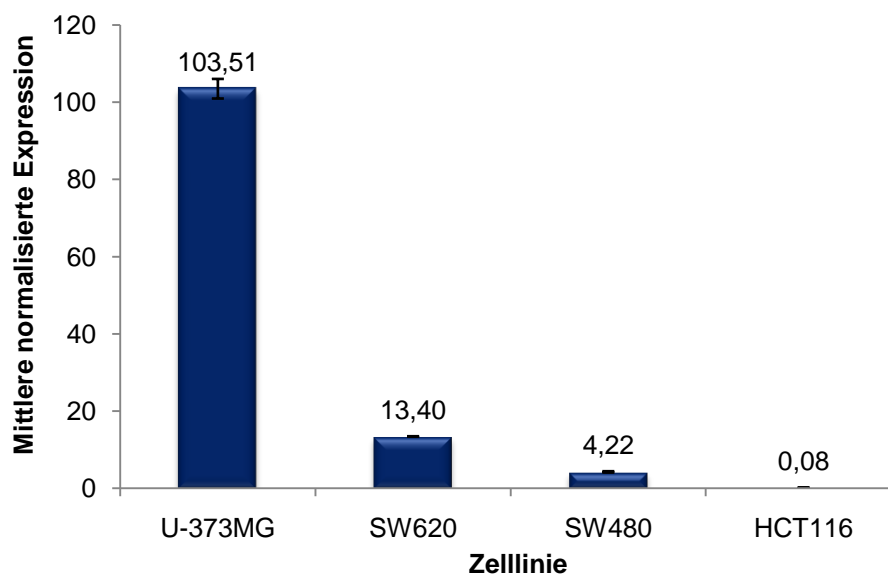


Abb. 4.4: Expression von HtrA1 in verschiedenen Zelllinien

Die mittlere normalisierte Expression von HtrA1 wurde mittels QPCR bestimmt.

Die QPCR-Analyse der relativen Expression von HtrA1 hat große Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien ergeben. Die höchste Expression war in U-373MG, einer Glioblastom Astrocytom-Zelllinie, messbar. In den Kolorektalkarzinomzelllinien SW620, SW480 und HCT116 war die HtrA1-Expression deutlich geringer. Um Faktor 8 niedriger als in U-373MG ist die Expression in den SW620-Zellen und um Faktor 25 niedriger in SW480-Zellen. In HCT116 war die HtrA1-Expression kaum messbar und um Faktor 1300 geringer als in U-373MG.

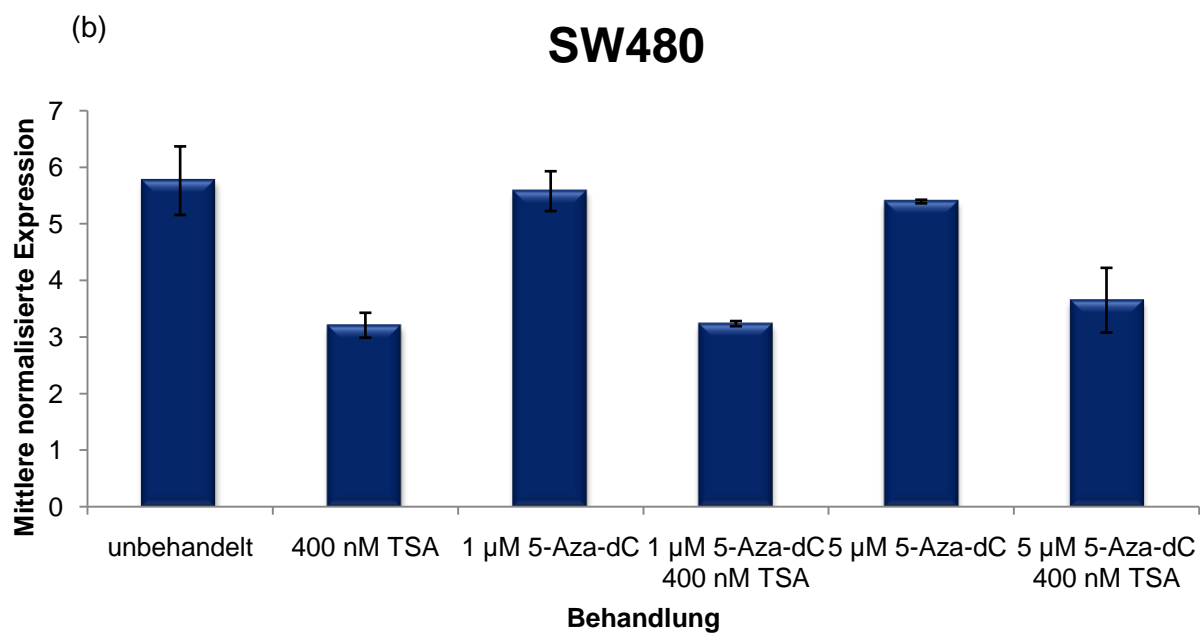
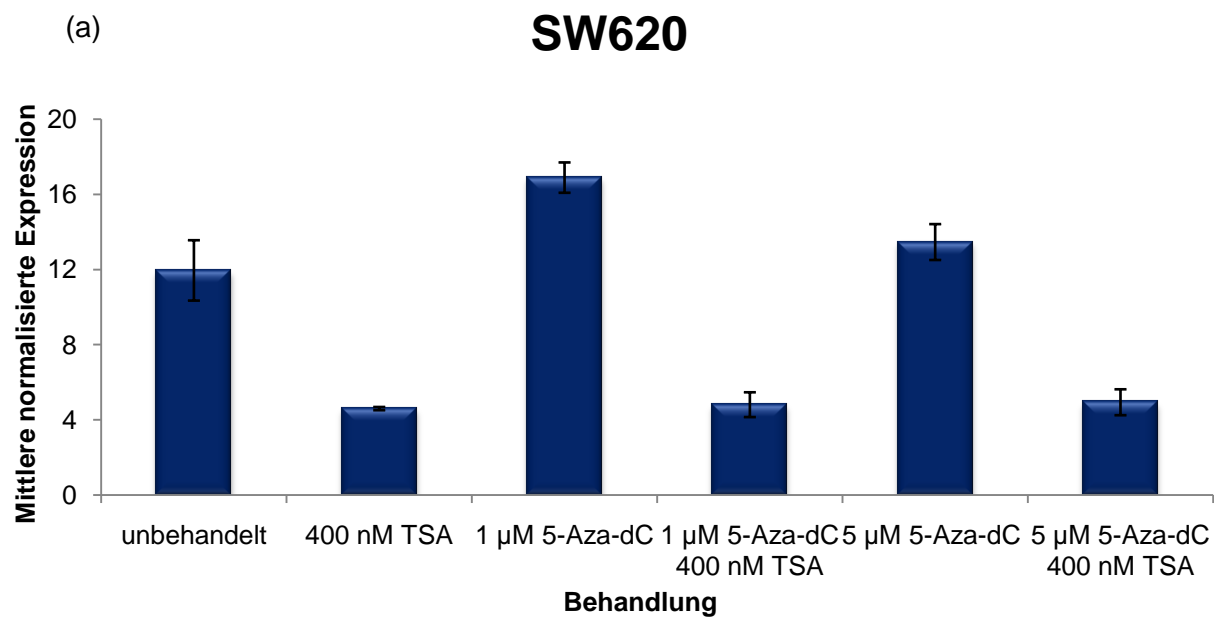
4.3 Der Einfluss epigenetischer Pharmazeutika auf die Expression von HtrA1

Die HtrA1-Expression ist in Tumorgewebe herunter reguliert. Bisher ist nicht bekannt, welcher Mechanismus für die Transkriptionsrepression von HtrA1 verantwortlich ist. Um Hinweise zu erhalten, welche Mechanismen für die Regulation der HtrA1-Expression in Frage kommen könnten, wurde der HtrA1-Promotor hinsichtlich des Vorhandenseins einer *CpG island* untersucht. Die bioinformatischen Untersuchungen haben ergeben, dass die Promotorregionen des humanen und des murinen HtrA1-Gens über eine *CpG island* verfügen (4.1). Dementsprechend könnten epigenetische Mechanismen für die Regulation der HtrA1-Genexpression eine Rolle spielen.

Um zu klären, ob DNA-Methylierung und Histondeacetylierung in die transkriptionelle Repression des HtrA1-Gens involviert sind, wurden verschiedene Tumorzelllinien, die sich anhand ihres HtrA1-Expressionslevels unterscheiden (4.2), mit 5-Aza-dC und TSA behandelt. Bei 5-Aza-dC handelt es sich um eine Substanz, die die Demethylierung von DNA vermittelt. Es inkorporiert in die Nucleinsäuren sich teilender Zellen und inaktiviert die DNMTs (DNA-Methyltransferasen) durch Bildung eines stabilen Komplexes zwischen dem 5-Aza-dC in der DNA und dem Enzym (Sheikhnejad *et al.* 1999).

TSA ist ein Fungizid aus *Streptomyces hygroscopicus*, das HDACs (Histondeacetylasen) inhibiert und dementsprechend zur Akkumulation acetylierter Histone führt (Tsuji *et al.* 1976, Yoshida *et al.* 1990). Es wurde außerdem beschrieben, dass TSA sowohl die G1-, als auch die G2-Phase des Zellzyklus inhibieren kann (Beamish, Warrener & Gabrielli 2004).

Für die Behandlung der Zellen mit 5-Aza-dC und TSA wurden 1×10^6 Zellen auf einer 6 cm-Schale ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden verschiedene Konzentrationen von 5-Aza-dC zu den Zellen gegeben. Das 5-Aza-dC-haltige Medium wurde aufgrund der Instabilität von 5-Aza-dC alle 24 h gewechselt. Mit der TSA-Behandlung wurde nach 72 h Inkubation begonnen. Nach 96 h wurde RNA (3.2.2.14) aus den Zellen isoliert und für die Synthese von cDNA verwendet (3.2.2.16). Die HtrA1-Genexpression wurde dann mittels QPCR (3.2.2.13) untersucht.



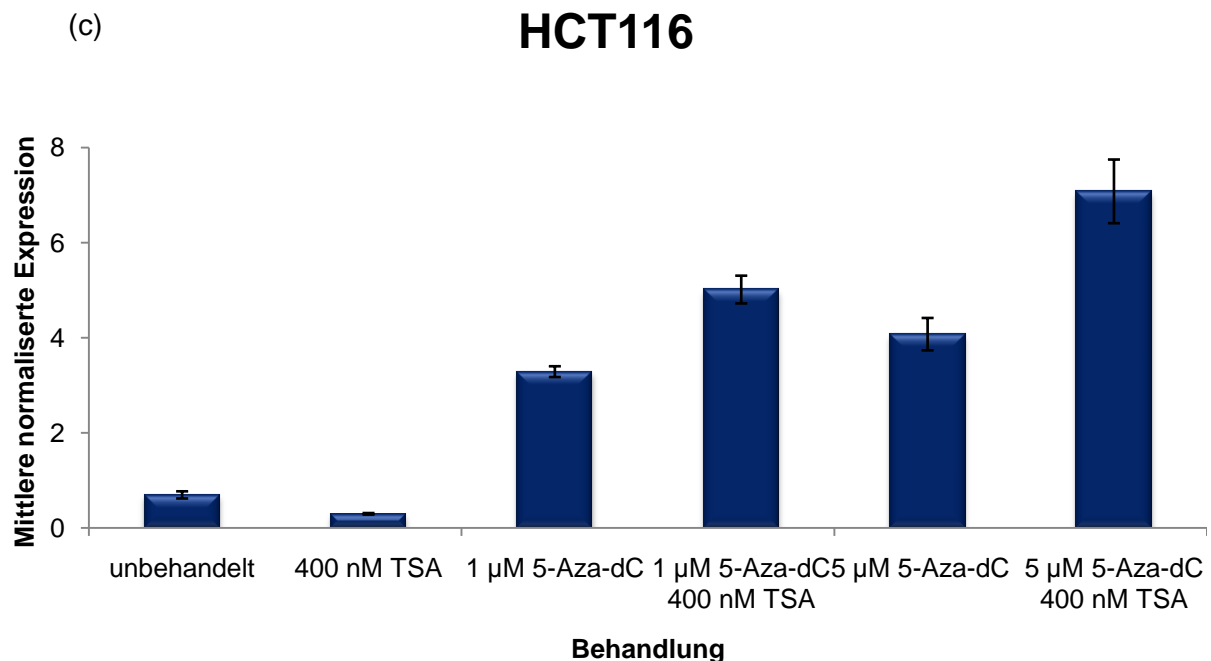


Abb. 4.5: HtrA1-Expression nach Behandlung mit 5-Aza-dC und TSA.

Die Zelllinien (a) SW620 (b) SW480 und (c) HCT116 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an 5-Aza-dC und TSA behandelt. Die HtrA1-Genexpression in den Zellen wurde mittels QPCR bestimmt.

In den SW620-Zellen konnten nach 5-Aza-dC- und TSA-Behandlung Änderungen der HtrA1-Expression beobachtet werden (Abb. 4.5 (a)). Die Behandlung der SW620-Zellen mit 5-Aza-dC führte zu geringen Änderungen der HtrA1-Expression um maximal das 1,4fache, wohingegen die TSA-Behandlung eine signifikante Reduktion der HtrA1-Expression bis zu Faktor 2,6 bewirkte. Die Kombinationsbehandlung mit 5-Aza-dC und TSA führte ebenfalls zu einer Reduktion der Expression um bis zu Faktor 2,4.

In SW480-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede nach der Behandlung mit 5-Aza-dC (Abb. 4.5 (b)) beobachtet werden. Die TSA-Behandlung führte in den SW480-Zellen jedoch zu einer Reduktion der HtrA1-Expression um Faktor 1,8.

Eine erhebliche HtrA1-Expressionssteigerung konnte in HCT116-Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC allein oder in Kombination mit TSA beobachtet werden (Abb. 4.5 (c)). Dabei erfolgte die Steigerung in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis der epigenetischen Pharmazeutika. Die Kombinationsbehandlung mit 1 µM 5-Aza-dC und 400 nM TSA steigerte die Expression um das 7,2fache, die Behandlung mit 5 µM 5-Aza-dC und 400 nM TSA um das 10,2fache, wobei die Kombinationsbehandlung die Expressionssteigerung im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 5-Aza-dC jeweils verstärkte. Lediglich die Einzelbehandlung der Zellen mit TSA führte zu einer 2,4fachen Reduktion der HtrA1-Expression.

4.4 Methylierung des *HtrA1*-Promotors

Die Behandlung verschiedener Zelllinien mit dem DNMT-Inhibitor 5-Aza-dC und dem Histondeacetylaseinhibitor TSA führt in HCT116-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der *HtrA1*-Expression (4.3). Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass die *HtrA1*-Genexpression epigenetisch reguliert ist. Die Behandlung mit 5-Aza-dC und TSA ist jedoch sehr unspezifisch und beeinflusst alle Gene, die durch Promotorhypermethylierung und Histondeacetylierung inaktiviert sind. Um gezielter zu untersuchen, ob die DNA-Methylierung für die Expressionsregulation des *HtrA1*-Gens verantwortlich ist, wurde der *HtrA1*-Promotor spezifisch hinsichtlich der Methylierung der CpG-Stellen untersucht. Dafür wurden verschiedene Zelllinien, die unterschiedliche *HtrA1*-Expressionslevel aufweisen, verwendet. Zunächst wurde genomische DNA aus den zu analysierenden Zelllinien isoliert (3.2.1.14). Die genomische DNA wurde dann mit Bisulfit behandelt (3.2.1.15), was eine Konversion der unmethylierten Cytosine zu Uracil bewirkt. Da methylierte Cytosine während der Bisulfit-Behandlung nicht verändert werden, kann nach der Bisulfit-Behandlung ein ursprünglich methyliertes Cytosin von einem unmethylierten Cytosin unterschieden werden. Mit Hilfe der *Bisulfite Sequencing PCR* (BSP) (3.2.1.16) wurden dann gezielt Bereiche des *HtrA1*-Promotors amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden durch TOPO-TA-Klonierung in einen Vektor eingebracht und transformiert (3.2.1.17). Die positiven Klone wurden am nächsten Tag mit Hilfe der direkten Bakterien-Kolonie-PCR (3.2.1.9) identifiziert und für das Beimpfen von *ÜN*-Kulturen für Plasmid-Minipräparationen (3.2.1.12) benutzt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend sequenziert (3.2.1.11). Die Auswertung der Sequenzierdaten hinsichtlich der Methylierung erfolgte mit Hilfe der *Software* BIQAnalyzer.

Für die Untersuchung der DNA-Methylierung innerhalb des *HtrA1*-Promotors wurden zwei Regionen ausgewählt, um einen möglichst umfassenden Eindruck der Methylierung zu bekommen. Untersucht wurde der Bereich zwischen 388 bp und -115 bp innerhalb der 5'-UTR und der Bereich zwischen 286 bp und 484 bp innerhalb der CDS. Die analysierten Bereiche sind in Abb. 4.6 dargestellt.

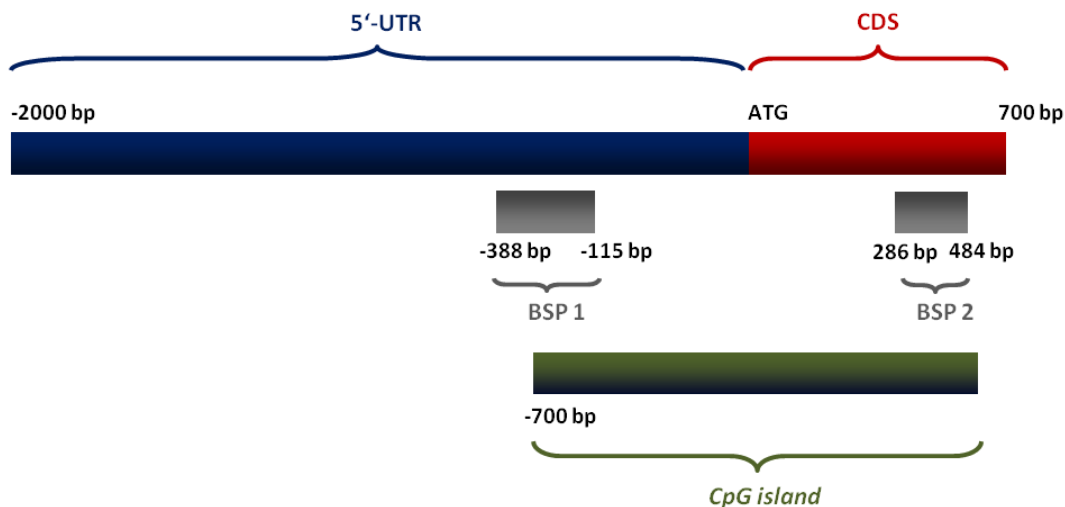


Abb. 4.6: Schematische Darstellung der humanen HtrA1-Promotorregion und der mittels BSP untersuchten Bereiche

Dargestellt sind die hinsichtlich der DNA-Methylierung untersuchten Bereiche BSP 1 und BSP 2 (grau) innerhalb der *CpG island* (grün) des HtrA1-Promotors.

In Abb. 4.7 ist die Auswertung der BSP 1 für die verschiedenen untersuchten Krebszelllinien in Form der sogenannten *Lollipop*-Darstellung widergegeben. Dabei repräsentieren die schwarz-ausgefüllten Kreise ein methyliertes Cytosin und die weißen Kreise ein unmethyliertes Cytosin. Ein Strich deutet an, dass an dieser Position während des *Alignments* der Sequenzierungsergebnisse mit der genomischen Sequenz keine Base zugeordnet werden konnte. In Abb. 4.7 ist zunächst das Ergebnis für die BSP 1 dargestellt.

Es wurden vier Einzelklone jeder Zelllinie sequenziert. Die Methylierungsanalyse des HtrA1-Promotors Bereich zwischen -388 bp und -115 bp hat ergeben, dass die Zelllinien große Unterschiede in ihrem Methylierungsmuster aufweisen. In der Zelllinie HCT116 war eine fast vollständige Methylierung dieses Bereichs zu erkennen. Von 152 untersuchten Cytosinen in den vier Einzelklonen waren 140 methyliert. In den SW620-Zellen wurden hingegen nur drei methylierte Cytosine detektiert, in SW480 nur eins. Eine vollständige Demethylierung konnte in den U-373MG-Zellen nachgewiesen werden, wobei in drei Klonen an Position 29 der analysierten Cytosine während des *Alignments* keine Base zugeordnet werden konnte. In diesem Bereich ist die analysierte Sequenz hochrepetitiv.

Sequenzierungsergebnisse BSP 1

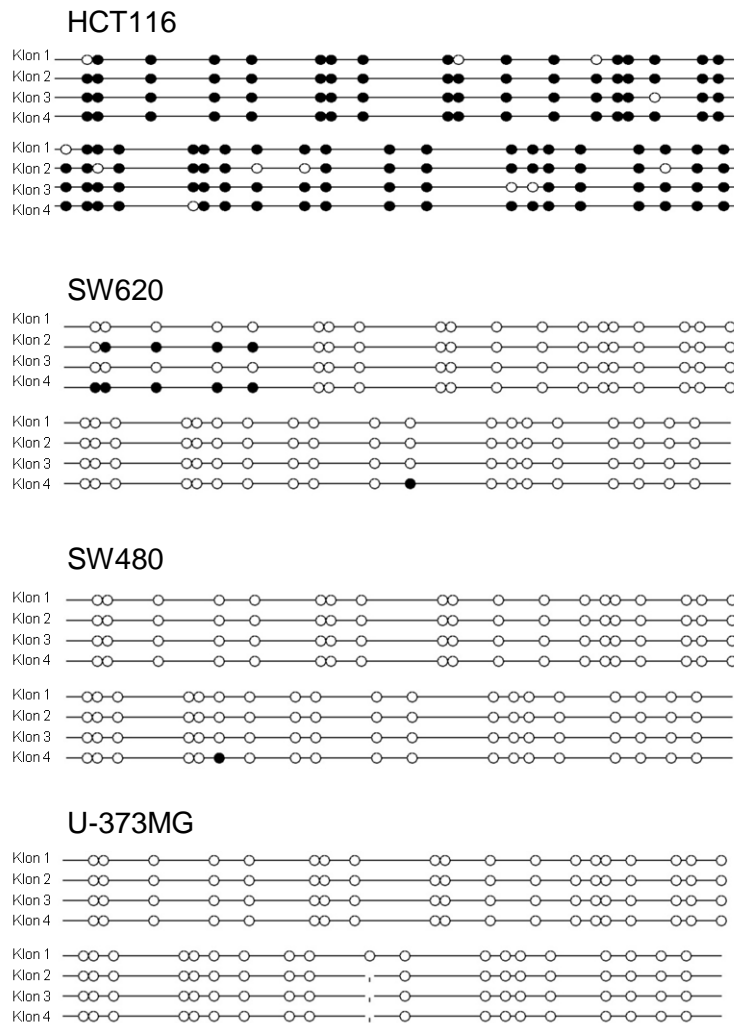


Abb. 4.7. Methylierung des humanen HtrA1-Promotors zwischen -388 bp und -115 bp

Pro Zelllinie wurden vier Einzelklone sequenziert. Die schwarzen Kreise repräsentieren ein methyliertes Cytosin, die weißen Kreise ein unmethyliertes Cytosin.

Die Methylierungsanalyse des HtrA1-Promotors im Bereich zwischen 286 bp und 484 bp, die in Abb. 4.8 dargestellt ist, lieferte ähnliche Ergebnisse. In dieser Region war ebenfalls eine fast vollständige Methylierung in den HCT116-Klonen zu beobachten. 81 der 88 analysierten Cytosine waren methyliert. In den anderen drei Zelllinien wurden nur vereinzelt methylierte Cytosine detektiert. In SW620 waren vier Cytosine methyliert, in SW480 eins und in U-373MG zwei.

Sequenzierungsergebnisse BSP 2

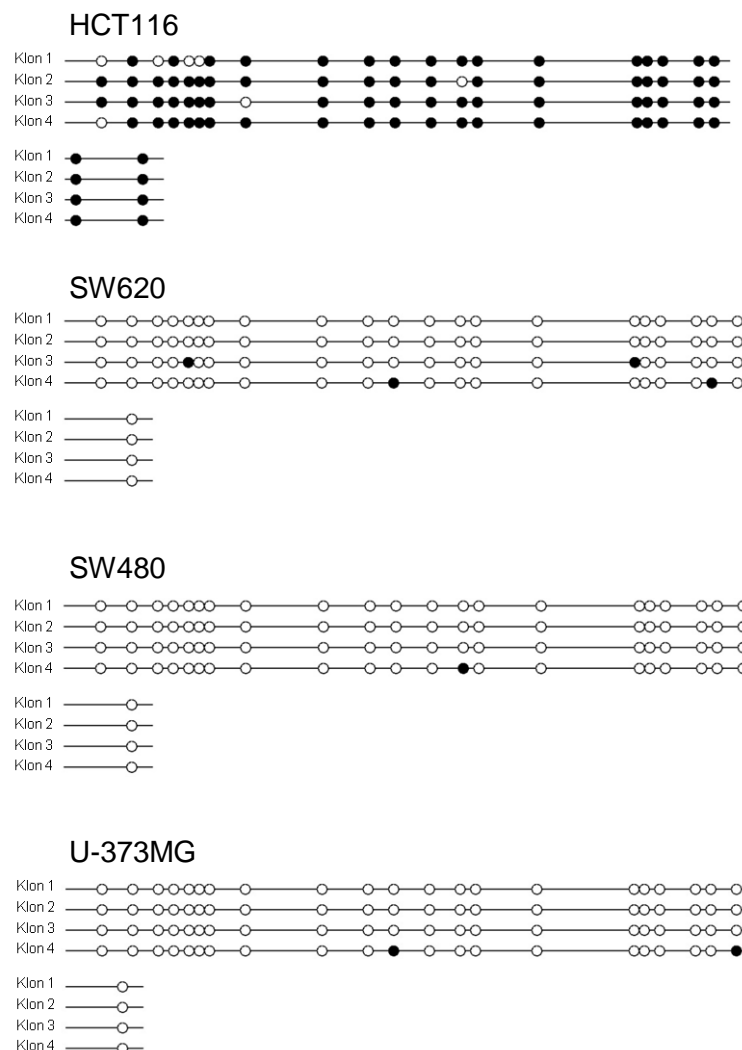


Abb. 4.8: Methylierung des humanen HtrA1-Promotors zwischen 286 bp und 484 bp

Pro Zelllinie wurden vier Einzelklone sequenziert. Die schwarzen Kreise repräsentieren ein methyliertes Cytosin, die weißen Kreise ein unmethyliertes Cytosin.

4.5 Methylierung von *HtrA1* in Polypen aus *APC^{Min/+}*-Mäusen

Die Tumorigenese des Kolorektalkarzinoms verläuft über verschiedene histologische Stufen, die durch bestimmte genetische und epigenetische Veränderungen gekennzeichnet sind. Das *APC^{Min/+}*-Mausmodell ahmt diesen Prozess der Krebsentstehung nach. Die Mäuse

weisen eine Punktmutation in Codon 850 des APC-Gens auf, die eine Verkürzung des codierten Proteins bewirkt (Moser, Pitot & Dove 1990). Eine ähnliche Mutation ist häufig bei Patienten, die an Familiärer Adenomatöser Polyposis (FAP) leiden, und bei sporadischen Tumoren zu finden (Fearnhead, Britton & Bodmer 2001). Die FAP-Patienten entwickeln zahlreiche, meist hunderte Polypen im Dickdarm, die potentiell entarten und zur Entstehung von Krebs führen können. Die APC^{Min/+}-Mäuse entwickeln ebenfalls bereits sehr früh zahlreiche Polypen innerhalb des Dickdarms.

Um zu untersuchen, ob HtrA1 für die Tumorigenese in den Mäusen von Bedeutung ist, wurde genomische DNA aus Polypen, die aus APC^{Min/+}-Mäusen isoliert wurden, hinsichtlich der Methylierung untersucht. Die DNA wurde freundlicherweise von Dr. Lee Parry, University of Cardiff, zur Verfügung gestellt. Mit der genomischen DNA wurde eine Bisulfit-Behandlung (3.2.1.15) durchgeführt, um anschließend mittels BSP (3.2.1.16) gezielt einen Bereich des Promotors zu amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden durch TOPO-TA-Klonierung in einen Vektor eingebracht und transformiert (3.2.1.17). Die positiven Klone wurden am nächsten Tag mit Hilfe der direkten Bakterien-Kolonie-PCR (3.2.1.9) identifiziert und für das Beimpfen von ÜN-Kulturen für Plasmid-Minipräparationen (3.2.1.12) benutzt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend sequenziert (3.2.1.11). Die Auswertung der Sequenzierdaten hinsichtlich der Methylierung erfolgte mit Hilfe der *Software* BIQAnalyzer.

Die Methylierungsanalyse erfolgte im Bereich zwischen -252 bp bis -12 bp innerhalb der Promotorregion des murinen HtrA1-Gens (Abb. 4.9).

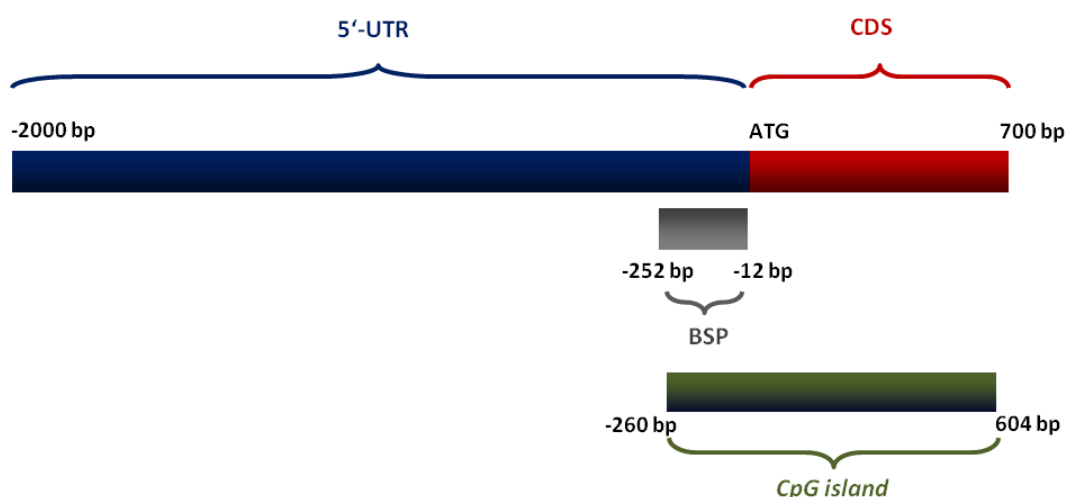


Abb. 4.9: Schematische Darstellung der murinen HtrA1-Promotorregion und des auf die Methylierung hin untersuchten Bereiches

Dargestellt ist der mittels BSP analysierte Bereich (grau) innerhalb der *CpG island* (grün) des HtrA1-Promotors.

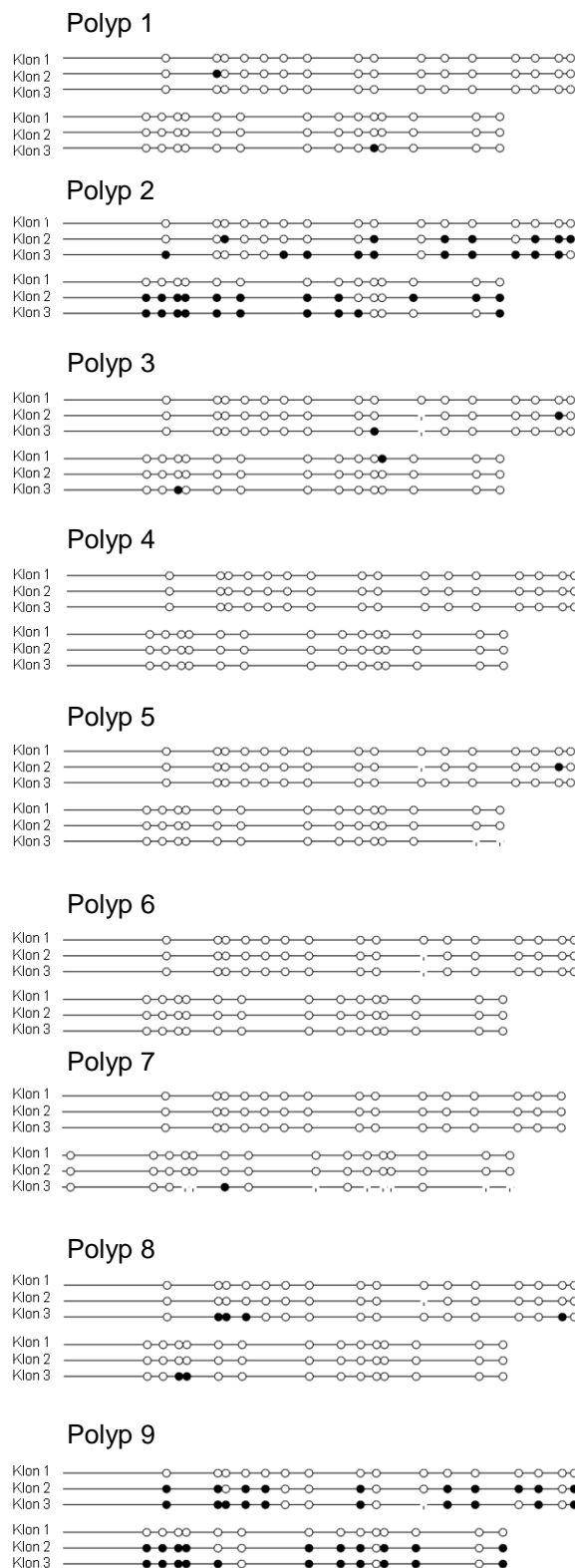


Abb. 4.10: Methylierung des murinen HtrA1-Promotors zwischen -252 bp bis -12 bp in Polypen, die aus einer APC^{Min/+}-Maus isoliert wurden

Pro Polyp wurden drei Einzelklone sequenziert. Die schwarzen Kreise repräsentieren ein methyliertes Cytosin, die weißen Kreise ein unmethyliertes Cytosin.

Zunächst wurden neun verschiedene Polypen aus einer APC^{Min/+}-Maus untersucht. In Abb. 4.10 ist die Auswertung der BSP in Form der sogenannten *Lollipop*-Darstellung wiedergegeben. Pro Polyp wurden drei Einzelklone sequenziert.

Die Methylierungsanalyse hat ergeben, dass in Polyp 2 und Polyp 9 bei Klon 2 und Klon 3 eine signifikante Methylierung des HtrA1-Promotors zu beobachten ist. Von den insgesamt 90 analysierten Cytosinen, sind 38 bei Polyp 1 und 41 bei Polyp 9 methyliert. Bei den Polypen 1, 3, 5, 7 und 8 sind maximal sechs methylierte Cytosine zu erkennen. Polyp 4 und Polyp 6 sind vollständig unmethyliert.

4.6 Methylierung des murinen HtrA1-Promotors und HtrA1-Expression

Die Analyse der DNA-Methylierung des HtrA1-Promotors in Polypen aus APC^{Min/+}-Mäusen hat ergeben, dass einige Polypen eine Hypermethylierung des Promotors aufweisen (4.5). Um zu untersuchen, ob die Methylierung des HtrA1-Promotors mit der HtrA1-Expression korreliert, wurde genomische DNA aus fünf verschiedenen Polypen zunächst hinsichtlich der Methylierung untersucht. Außerdem wurde die korrespondierende RNA aus den Polypen für die Untersuchung der HtrA1-Expression mittels QPCR verwendet. Die untersuchten DNA- und RNA-Proben wurden freundlicherweise von Dr. Lee Parry, University of Cardiff, zur Verfügung gestellt.

Die Methylierungsanalyse wurde wie in 4.5 durchgeführt. Das Ergebnis der mit Hilfe der *Software* BIQAnalyzer ausgewerteten Sequenzierdaten ist in Abb. 4.11 dargestellt. Die Untersuchung der fünf Polypen aus fünf verschiedenen APC^{Min/+}-Mäusen hat ergeben, dass zwei der getesteten Polypen, Polyp 18 und Polyp 101, eine Hypermethylierung des HtrA1-Promotors in allen drei getesteten Klonen aufweisen. Bei Polyp 18 sind 89 der 90 analysierten Cytosine methyliert, bei Polyp 101 sind es 70. Die Polypen 13 und 22 waren vollständig unmethyliert.

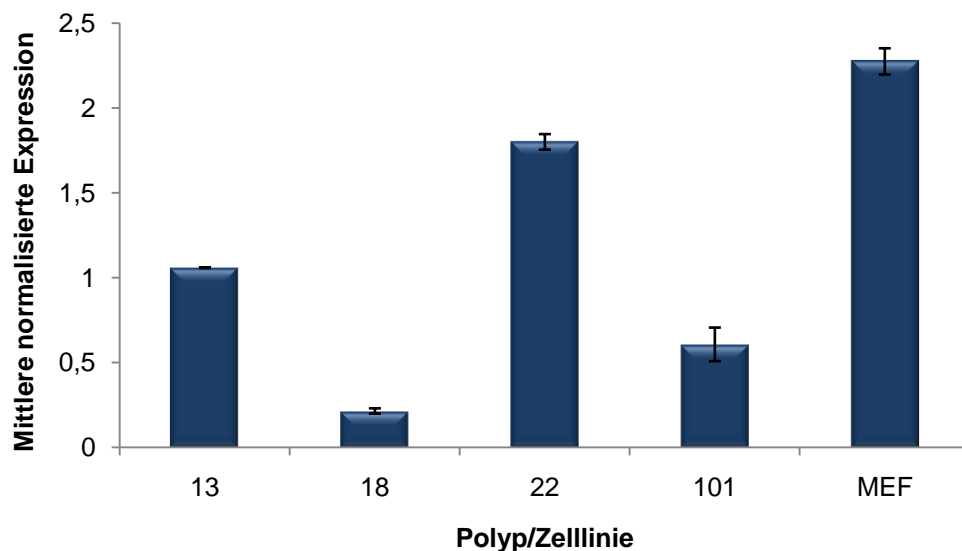


Abb. 4.12: HtrA1-Expression in verschiedenen Polypen aus APC^{Min/+}-Mäusen und MEF-Zellen
Die Expression von HtrA1 wurde mittels QPCR-Analyse ermittelt.

4.7 Spezifische Inhibition von MBD2 mittels shRNA

4.7.1 Suppression von MBD2

Die Analyse der Methylierung des HtrA1-Promotors hat gezeigt, dass HCT116-Zellen eine Hypermethylierung des Promotors aufweisen (4.4). Diese Methylierung korreliert mit einer stark verminderten HtrA1 mRNA-Expression (4.2). Bisher ist unbekannt, welche Faktoren für das Übersetzen der DNA-Methylierung in die Genexpressionsregulation verantwortlich sind. Ein Hinweis für einen möglichen Faktor, der in diesem Prozess eine Rolle spielen könnte, ergab sich aus Experimenten, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alan Clarke, Universität von Cardiff durchgeführt wurden. Mit Hilfe von cDNA-Microarrays wurden differentiell exprimierte Gene in MBD2^{-/-}-Mäusen identifiziert. Dabei konnte HtrA1 als in den MBD2^{-/-}-Mäusen hoch reguliertes Gen gefunden werden. Demnach spielt MBD2 möglicherweise eine Rolle für die Genexpressionsregulation von HtrA1. MBD2 gehört zu der MBD-Proteinfamilie, deren Mitglieder mit ihrer MBD an DNA binden. Einige MBD-Proteine, u.a. auch MBD2, sind außerdem in der Lage über eine Transkriptionsrepressordomäne die Genexpression zu inhibieren.

Um zu kontrollieren, ob MBD2 für die Regulation der HtrA1-Expression von Bedeutung ist, wurde die MBD2-Expression mit Hilfe der RNAi-Technologie spezifisch inhibiert. Dazu

wurden HCT116 und SW620-Zellen durch lentiviralen Gentransfer mit shMBD2-Konstrukten transduziert (3.2.2.5). Für den Gentransfer wurden die beiden Konstrukte pLKO1.shMBD2b und pLKO1.shMBD2c verwendet und auf die Suppressionseffizienz hin untersucht. Als Kontrolle wurden außerdem Zellen, die mit dem lentiviralen Leervektor pLKO1.puro und pLKO1.*nonsense* RNA transduziert wurden, verwendet.

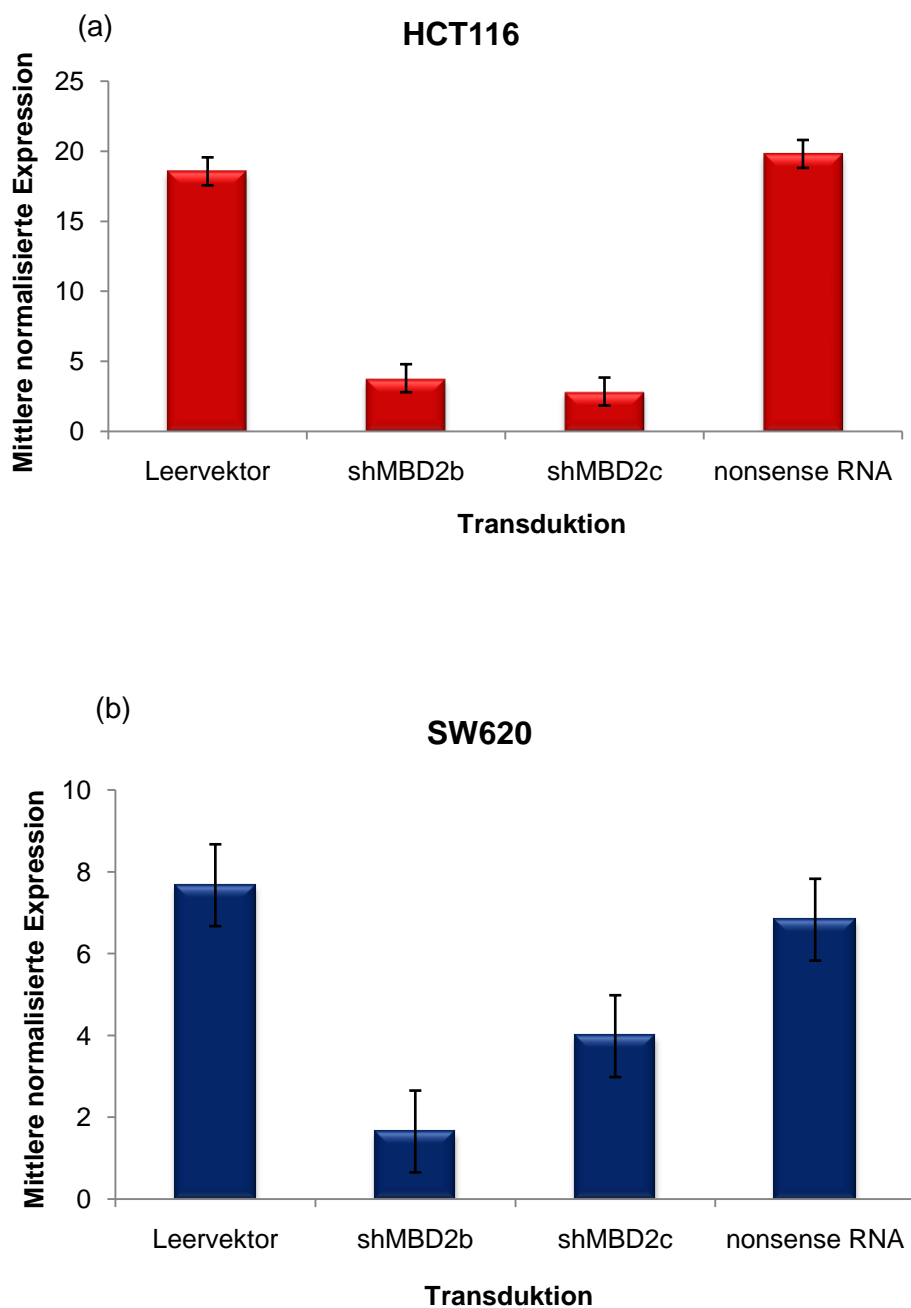


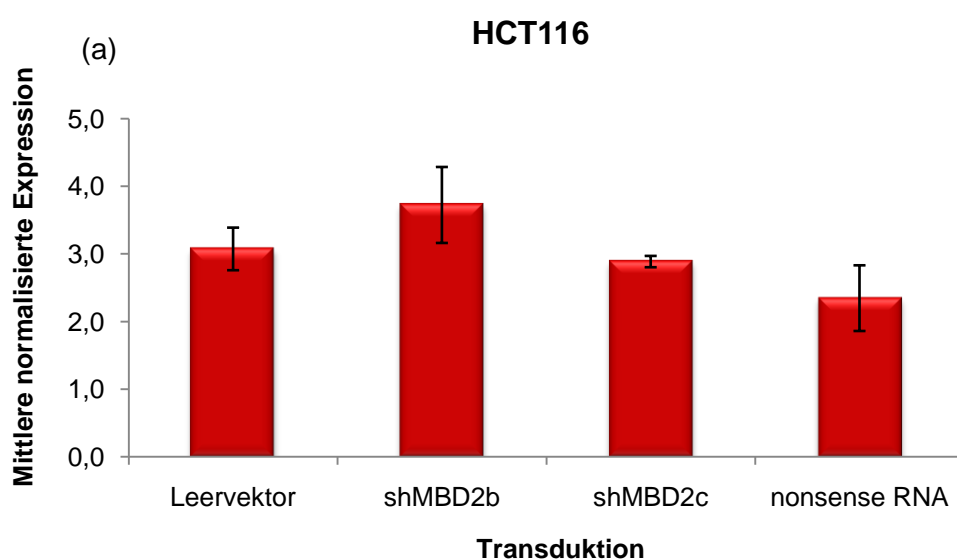
Abb. 4.13: Expression von MBD2 nach viraler Transduktion von shMBD2b

Die Expression von MBD2 in HCT116 (a) und SW60 (b) wurde mittels QPCR bestimmt.

Zunächst wurde der Erfolg der MBD2-Inhibition durch Messung der MBD2-mRNA-Expression mit Hilfe der QPCR kontrolliert (3.2.2.13). Das in Abb. 4.13 dargestellte Ergebnis der Expressionsanalyse von MBD2 zeigt, dass sowohl der shMBD2b-Vektor, als auch der shMBD2c-Vektor eine Reduktion der MBD2-Expression bewirken konnten. Das shMBD2b-Konstrukt führte in HCT116-Zellen zu einer 4,9fachen, in SW620-Zellen zu einer 4,6fachen Reduktion der MBD2-Expression. Eine 6,5fache Reduktion in HCT116 bzw. eine 1,9fache Reduktion in SW620 wurde durch das shMBD2c-Konstrukt vermittelt. Die viralen Konstrukte mit dem Leervektor und der *nonsense* RNA führten zu keiner signifikanten Änderung der MBD2 Expression.

4.7.2 Expression von MBD1 und MeCP2 nach Suppression von MBD2

MBD2 gehört zur Familie der MBD-Proteine. Zwei weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie, MBD1 und MeCP2, sind, wie MBD2, in der Lage über eine Transkriptionsrepressordomäne die Genexpression zu inhibieren. Sie verfügen außerdem über eine hohe Sequenzhomologie zu MBD2. Um zu analysieren, ob die Suppression von MBD2 Effekte auf die Expression von MBD1 und MeCP2 hat, wurde die Genexpression von MBD1 und MeCP2 mittels QPCR in den MBD2-transduzierten Zellen und den Kontrollzellen untersucht.



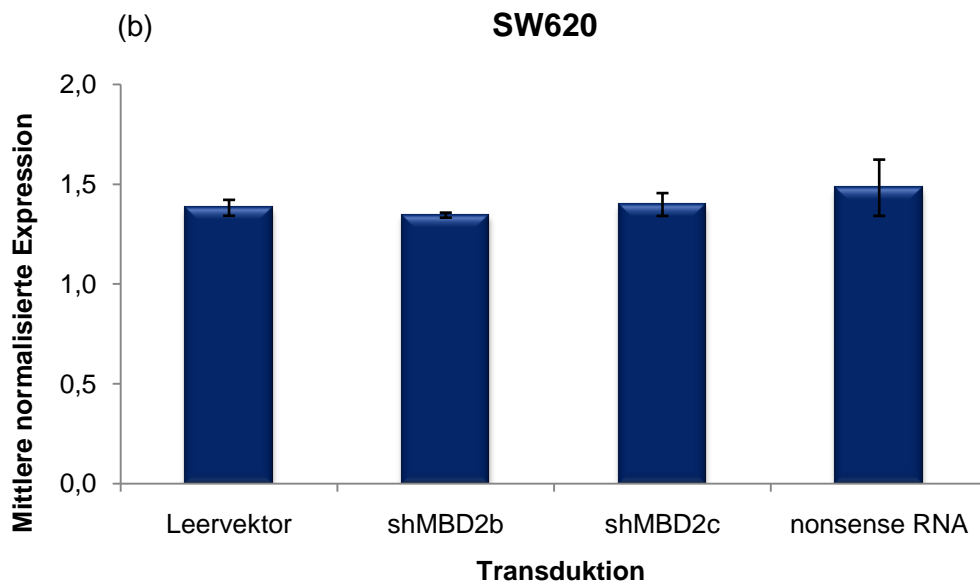
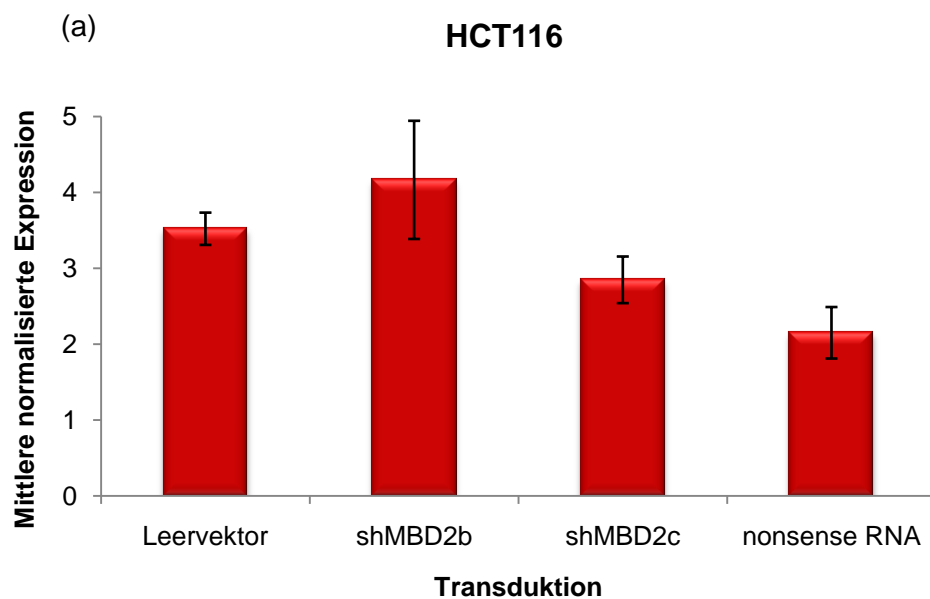


Abb. 4.14: Expression von MBD1 nach viraler Transduktion von shMBD2b

Die Expression von MBD2 in HCT116 (a) und SW60 (b) wurde mittels QPCR bestimmt.

Das in Abb. 4.14 dargestellte Ergebnis der MBD1-Expression, die mittels QPCR-Analyse bestimmt wurde, zeigt, dass die Suppression von MBD2 nur einen geringen Einfluss auf die MBD1-Expression in HCT116 und SW620-Zellen hatte. Die Expression schwankte in den Zelllinien lediglich um das 1 bis 1,3fache.

Das Ergebnis der QPCR-Analyse der MeCP2-Expression ist in Abb. 4.15 dargestellt.



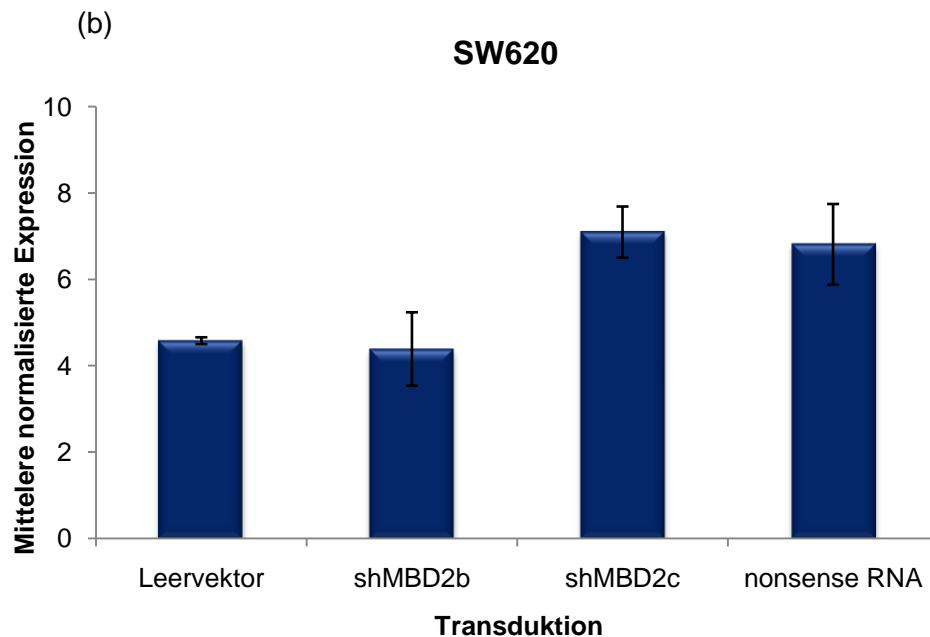


Abb. 4.15: Expression von MeCP2 nach viraler Transduktion von shMBD2b

Die Expression von MeCP2 in HCT116 (a) und SW60 (b) wurde mittels QPCR bestimmt.

Die MeCP2-Expression war in den HCT116- und SW620-Zellen etwas größeren Schwankungen als die MBD1-Expression unterworfen. In den HCT116-Zellen änderte sich die MeCP2-Expression maximal um das 1,5fache, bei den SW620-Zellen maximal um das 1,6fache. Dabei war jedoch keine Korrelation zwischen der Suppression von MBD2 und der Expressionsänderung von MeCP2 zu erkennen.

4.7.3 Expression von HtrA1 nach Suppression von MBD2

Um zu untersuchen, ob die Suppression von MBD2 wie im MBD2^{-/-}-Mausmodell Einfluss auf die HtrA1-Expression hat, wurde die HtrA1-Expression in den shMBD2b- und shMBD2c-transduzierten Zellen durch QPCR-Analyse ermittelt. Als Kontrolle für die HtrA1-Expression wurden erneut die mit dem lentiviralen Leervektor bzw. *nonsense* RNA-Vektor transduzierten Zellen verwendet.

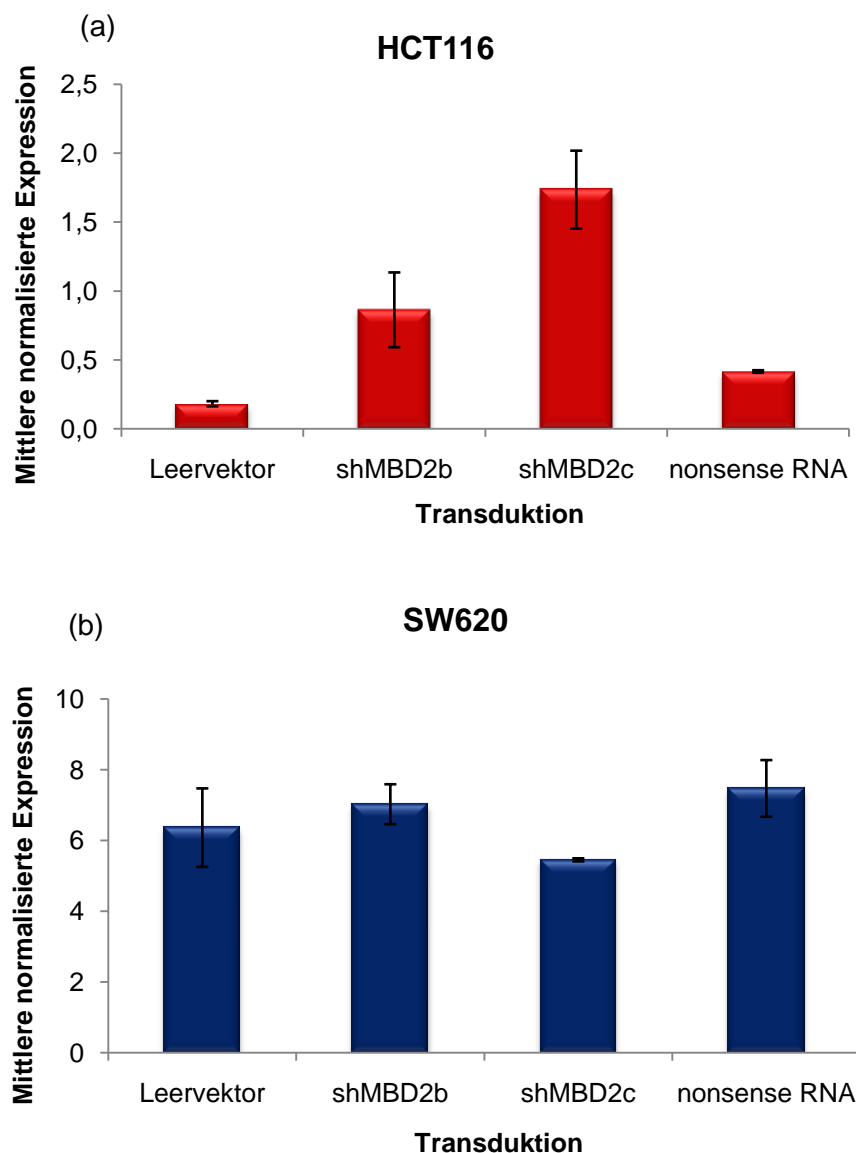


Abb. 4.16: Expression von HtrA1 nach viraler Transduktion von shMBD2

Die Expression von HtrA1 in HCT116 (a) und SW620 (b) wurde mittels QPCR bestimmt.

Wie in Abb. 4.16 (a) zu erkennen ist, war die HtrA1-Expression in den HCT116-Zellen nach Suppression der MBD2-Expression erhöht. In den shMBD2b-transduzierten Zellen wurde die Expression von HtrA1 um das 4,8fache, in shMBD2c-transduzierten Zellen um das 9,7fache gesteigert. Die *nonsense* RNA-Transduktion bewirkte eine schwache, um das 2,3fache erhöhte Expression.

In SW620-Zellen war, wie in Abb. 4.16 (b) zu erkennen ist, keine signifikante Änderung der HtrA1-Expression zu beobachten. Die gemessenen Expressionslevel veränderten sich maximal um das 1,2fache.

4.8 Reinigung von MBD2b

Die Mitglieder der MBD-Proteinfamilie verfügen über eine MBD, mit Hilfe derer sie an DNA binden können (Sansom, Maddison & Clarke 2007). Um zu untersuchen, ob MBD2 in der Lage ist *in vitro* an eine DNA-Sequenz zu binden, die methyliert ist und einem Teil des HtrA1-Promotors entspricht, sollte das Protein rekombinant hergestellt werden. Bei dem zu reinigenden Protein handelte es sich um die Isoform MBD2b, die N-terminal um 149 Aminosäuren im Vergleich zu MBD2a verkürzt ist.

Für die Reinigung wurde MBD2b zunächst in *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus-Zellen überexprimiert. Dabei wurde die Expression bei einer OD_{600} von 0,5 mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden dann für 4 h bei 37°C, 180 rpm inkubiert. Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Reinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie über Ni-TED-Säulen (3.2.3.3). Um den Erfolg der Reinigung zu kontrollieren, wurde nach allen Reinigungsschritten ein Aliquot abgenommen und mit Hilfe der SDS-PAGE (3.2.3.1) und anschließender Coomassie Blau-Färbung (3.2.3.2) analysiert. In Abb. 4.17 ist exemplarisch der Verlauf einer MBD2b-Reinigung dargestellt.

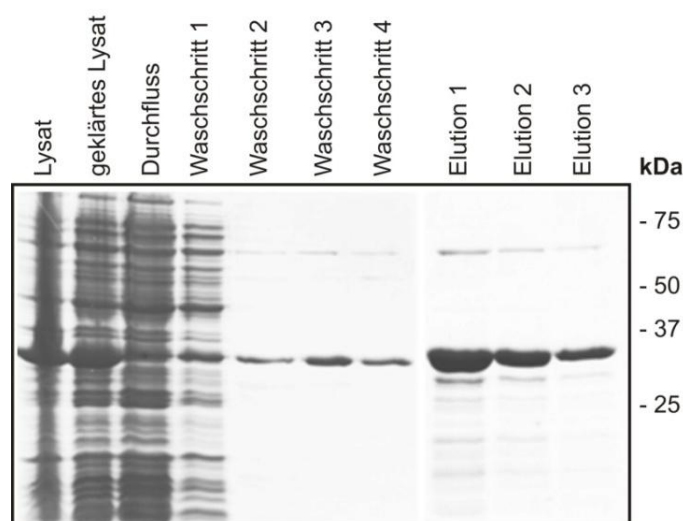


Abb. 4.17: Reinigung von MBD2b

MBD2b wurde in *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus-Zellen produziert. Die Reinigung des Proteins wurde mittels Affinitätschromatographie über Ni-TED-Säulen vorgenommen. Die Abbildung zeigt die SDS-PAGE-Analyse der Aliquots, die nach jedem Reinigungsschritt entnommen wurden (Waschschrift 1: LEW-Puffer, Waschschrift 2: LEW-Puffer, 1 M NaCl, Waschschrift 3: LEW-Puffer, 3 mM Imidazol, Waschschrift 4: LEW-Puffer, Elutionspuffer: LEW-Puffer, 250 mM Imidazol).

Auf dem in Abb. 4.17 gezeigten SDS-PAGE-Gel ist die effektive Induktion der MBD2b-Produktion anhand der Bande bei 31,5 kDa im Lysat zu erkennen. Nach Auftragen des geklärten Zelllysats auf die Ni-TED-Säulen konnten mit Hilfe der anschließenden

Waschschritte Verunreinigungen effizient von der Ni-TED-Säule entfernt werden, wobei es auch zu einem leichten Verlust an MBD2b kam. Durch Steigerung der Imidazol-Konzentration auf 250 mM im Elutionspuffer konnte MBD2b effektiv eluiert werden. Unterhalb der MBD2b-Banden sind Abbaubanden des Proteins zu erkennen, die anhand eines *Western-Blots* verifiziert wurden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin ist eine leichte Verunreinigung bei etwa 60 kDa zu sehen.

4.9 Reinigung der MBD von MBD2

Um zu untersuchen inwieweit die MBD von MBD2 (MBD_{MBD2}) für die Funktion des Proteins von Bedeutung ist, wurde dieser Abschnitt des Proteins rekombinant hergestellt. Die MBD_{MBD2} wurde in *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus-Zellen überexprimiert. Dabei wurde die Überexpression bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden dann für 4 h bei 37°C, 180 rpm inkubiert. Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Reinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie über Ni-TED-Säulen (3.2.3.3). Um den Erfolg der Reinigung zu kontrollieren, wurde nach allen Reinigungsschritten ein Aliquot abgenommen und mit Hilfe der SDS-PAGE (3.2.3.1) und anschließender Coomassie-Blau-Färbung (3.2.3.2) analysiert.

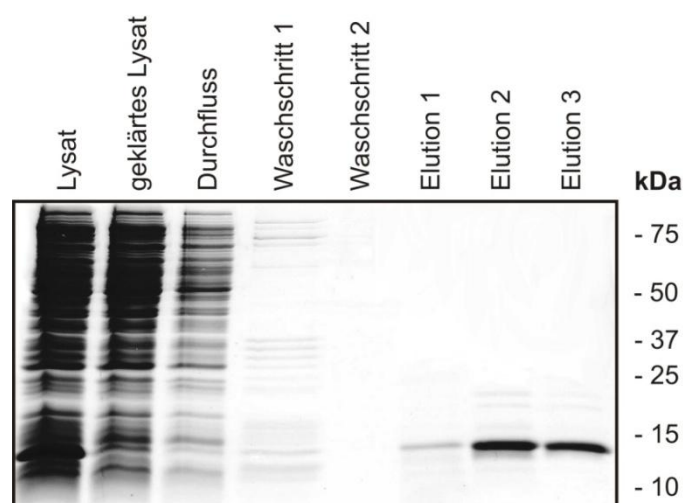


Abb. 4.18: Reinigung der MBD_{MBD2}

Die Überexpression der MBD_{MBD2} erfolgte in BL21 (DE3) Codon Plus-Zellen. Die Reinigung des Proteins wurde mittels Affinitätschromatographie über Ni-TED-Säulen vorgenommen. Die Abbildung zeigt die Analyse der Aliquots, die nach jedem Reinigungsschritt der Proteinlösung entnommen und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung analysiert wurden. (Waschschrift 1: LEW-Puffer, 1 M NaCl, 3 mM Imidazol; Waschschrift 2: LEW-Puffer; Elutionspuffer: LEW-Puffer, 250 mM Imidazol)

In Abb. 4.18 ist exemplarisch der Verlauf der Reinigung dargestellt. Das theoretische Molekulargewicht der MBD_{MBD2} beträgt 11,7 kDa. Auf dem dargestellten SDS-PAGE-Gel ist die effektive MBD_{MBD2} -Produktion im Zelllysats anhand der Bande auf der dem Molekulargewicht entsprechenden Höhe zu erkennen. Nach Auftragen des Zelllysats auf die Ni-TED-Säule konnten in den folgenden Waschschritten Verunreinigungen effizient entfernt werden. Mit dem Elutionspuffer, der 250 mM Imidazol enthielt, konnte das Protein dann effektiv eluiert werden. Der Reinheitsgrad des Proteins war sehr hoch. Anhand des Gels ist zu erkennen, dass lediglich geringe Verunreinigungen im MW-Bereich von 18-22 kDa vorhanden sind.

4.10 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

$MBD2$ verfügt über eine MBD, mit Hilfe derer es an methylierte DNA binden kann. Um zu untersuchen, ob das rekombinant hergestellte $MBD2b$ (4.8) *in vitro* an ein DNA-Oligonucleotid binden kann, das einem Ausschnitt des HtrA1-Promotors entspricht, wurde ein *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) etabliert. Dabei wurde untersucht, ob die gelelektrophoretische Mobilität der DNA nach Zugabe von $MBD2b$ vermindert ist. Bei dem verwendeten DNA-Oligonucleotid handelt es sich um ein 12 bp Nucleotid, das dem Bereich zwischen -376 bp und -364 bp innerhalb des HtrA1-Promotors entspricht (Abb. 4.19). Dieses Oligonucleotid soll im Folgenden als HtrA1-Oligonucleotid bezeichnet werden.

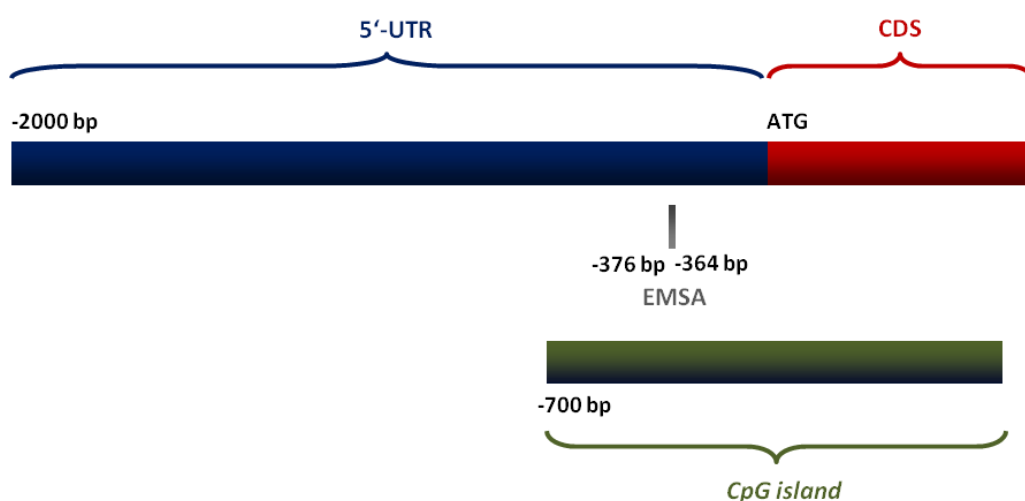


Abb. 4.19: Schematische Darstellung der HtrA1-Promotorregion und der mittels eines EMSAs analysierte Promotorausschnitt

Mit Hilfe eines EMSAs wurde der Bereich zwischen -376 bp und -364 bp (grau) untersucht.

Neben der Untersuchung der MBD2b-Bindung an das HtrA1-Oligonucleotid, wurde außerdem eine Kontrollreaktion mit einem anderen DNA-Oligonucleotid durchgeführt, dass 2001 von Ohki und Kollegen für die Analyse der MBD-Struktur des MBD1-Proteins in Komplex mit methylierter DNA verwendet wurde. Sie konnten zeigen, dass die MBD des MBD1-Proteins methylierungsabhängig an diese DNA-Sequenz binden kann (Ohki *et al.* 2001).

Für den EMSA wurden zunächst die DNA-Oligonucleotide hergestellt. Dafür wurden die einzelsträngigen Oligonucleotide in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt, für 10 min auf 95°C erhitzt und dann langsam abgekühlt. Anschließend wurden die DNA-Oligonucleotide mit dem Protein in EMSA-Bindepuffer gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Bindungsreaktionen wurden dann auf ein natives 12%-TBE-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt. Als Beladungskontrollen wurden außerdem die DNA-Oligonucleotide aufgetragen. Durch Ethidiumbromidfärbung wurden die DNA-Banden im Gel anschließend sichtbar gemacht (3.2.3.5).

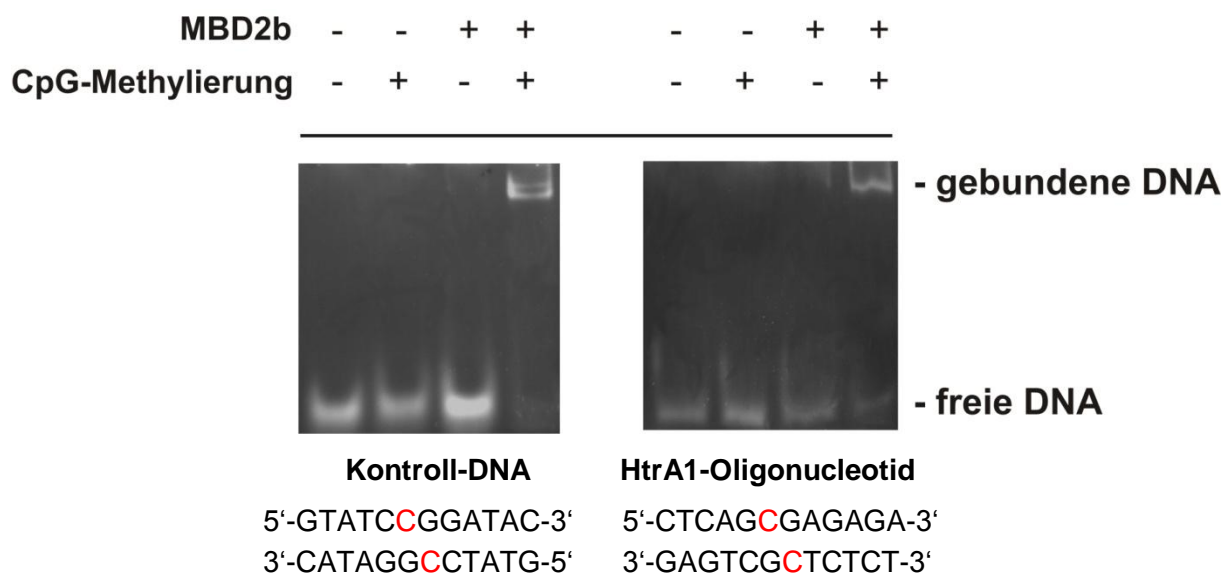


Abb. 4.20: EMSA mit MBD2b und verschiedenen DNA-Oligonucleotiden

Die DNA-Oligonucleotide wurden mit MBD2b in einem molaren Verhältnis von 1:1 in EMSA-Bindepuffer gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Komplexbildung wurde dann mittels Gelelektrophorese (12%-TBE-Gel) analysiert. Die Sequenzen der verwendeten DNA-Oligonucleotide sind angegeben, wobei das rot markierte C die Position der Methylierung angibt.

Das in Abb. 4.20 dargestellte Ergebnis des EMSAs zeigt, dass in Anwesenheit einer Methylgruppe am zentralen Cytosin in beiden getesteten DNA-Oligonucleotiden die DNA-Bande nach Zufügen von MBD2b verschoben war. MBD2b war demnach in der Lage an die methylierte DNA-Sequenz zu binden und die gelelektrophoretische Mobilität der DNA zu

vermindern. Da auf Höhe der freien DNA nur noch eine sehr schwache Bande sichtbar war, hat eine fast vollständige Bindung des zugegeben Proteins an die DNA stattgefunden. In Abwesenheit der Methylierung war die Verschiebung nicht zu beobachten. Demnach ist die Bindung von MBD2b an die DNA-Oligonucleotide abhängig vom Vorhandensein der Methylierung des zentralen Cytosins.

4.11 Einfluss verschiedener Substanzen auf die DNA-Bindungskapazität von MBD2b

MBD2 stellt ein interessantes Ziel für die Etablierung neuer Krebstherapiestrategien dar, da der *Knock-Out* von MBD2 in APC^{Min/+}-Mäusen zu einer erheblichen Reduktion der Tumorlast führt (Sansom, Maddison & Clarke 2007, Sansom *et al.* 2003). MBD2 ist assoziiert mit den Promotoren verschiedener Tumorsuppressorgene (Berger, Bird 2005, Wischnewski *et al.* 2007, Martin *et al.* 2008, Pheesse *et al.* 2008) und vermittelt die aberrante Transkriptionsrepression dieser Gene. MBD2 trägt somit zur Tumورprogression bei. Eine Inhibition der Interaktion zwischen MBD2 und methylierter DNA stellt demnach einen potentiellen Therapieansatz dar.

Um potentielle Inhibitoren der Interaktion zwischen MBD2 und methylierter DNA zu finden, wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Alan Clarke, Universität Cardiff, ein *High Throughput Screen* (HTS) im Cancer Research Technology Development Lab (CRT) durchgeführt. Im Rahmen dieses HTS wurden 54.000 Substanzen aus der CRT Substanzbibliothek auf ihre Fähigkeit hin, MBD2 zu inhibieren, untersucht. Dabei konnten einige inhibitorisch wirksame Substanzen identifiziert werden, welche die in Abb. 4.21 dargestellte Grundstruktur aufwiesen.

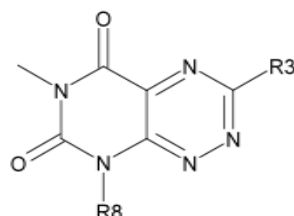


Abb. 4.21: Grundstruktur der im HTS identifizierten inhibitorisch wirksamen Substanzen

Um Inhibitoren der Interaktion von MBD2 mit methylierter DNA zu identifizieren, wurden im Rahmen eines HTS 54.000 Substanzen untersucht. Die als inhibitorisch wirksamen Substanzen wiesen die dargestellte Grundstruktur auf.

Die untersuchten Substanzen waren jedoch sehr toxisch und kamen als potentielle Pharmazeutika zur Therapie von Krebserkrankungen nicht in Frage. Aus diesem Grund sollten weitere Derivate mit der in Abb. 4.21 gezeigten Grundstruktur mit Hilfe des EMSAs hinsichtlich ihrer Fähigkeit die Interaktion zwischen MBD2 und dem methylierten DNA-Oligonucleotid, das einem Teil der HtrA1-Promotors entspricht, untersucht werden.

Für die Analyse wurden 68,5 pmol DNA-Oligonucleotid, 68,5 pmol MBD2b und 685 pmol der zu testenden Substanzen in EMSA-Bindepuffer gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf ein 12%-TBE-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt. Außerdem wurde eine DNA-Kontrolle aufgetragen, die kein Protein und kein Derivat der Inhibitoren enthielt, um die Laufhöhe der ungebundenen DNA zu bestimmen. Weiterhin wurde eine Positivkontrolle mitgeführt, die kein Derivat der Inhibitoren enthielt, um die effiziente Bindung von MBD2b an die die methylierte DNA zu kontrollieren. Durch Ethidiumbromidfärbung wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht (Abb. 4.22).

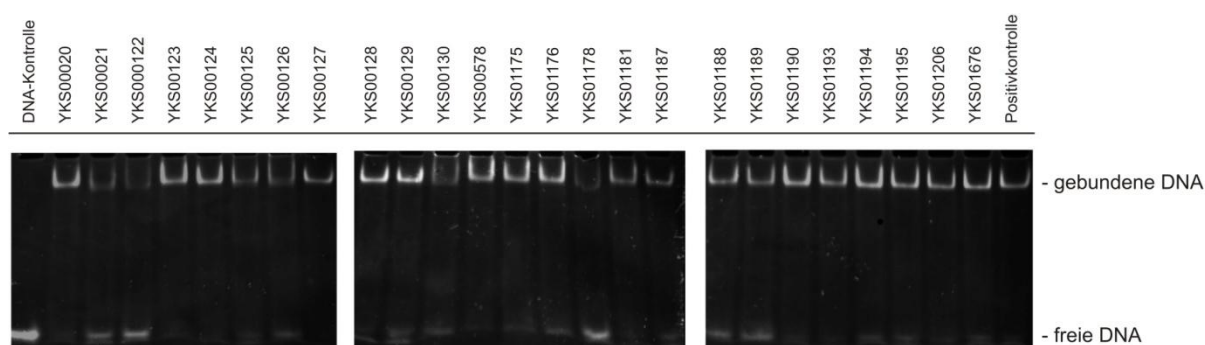


Abb. 4.22: EMSA mit verschiedenen Substanzen, die Derivate der im HTS identifizierten Inhibitoren von MBD2 darstellen

Es wurde der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Interaktion von MBD2b mit dem methylierten HtrA1-Oligonucleotid untersucht. Dabei wurden MBD2b und das HtrA1-Oligonucleotid in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt. Die Substanzen wurden der Reaktion im 10-fachen molaren Überschuss zugefügt.

Mit Hilfe des EMSAs konnten mehrere effektive Inhibitoren der Interaktion zwischen DNA-Oligonucleotid und MBD2b identifiziert werden. Insbesondere die Substanzen YKS00021, YKS00122 und YKS01178 führten zu einer erheblichen Inhibition der Bindung, was anhand der deutlich intensiveren Banden auf Höhe der freien DNA und der erheblich schwächeren Banden auf Höhe der gebundenen DNA-Fraktion zu erkennen ist. Substanz YKS01178 war dabei der effektivste Inhibitor der Bindungsreaktion. In Abb. 4.23 sind die Strukturen der drei inhibitorisch wirksamsten Substanzen dargestellt.

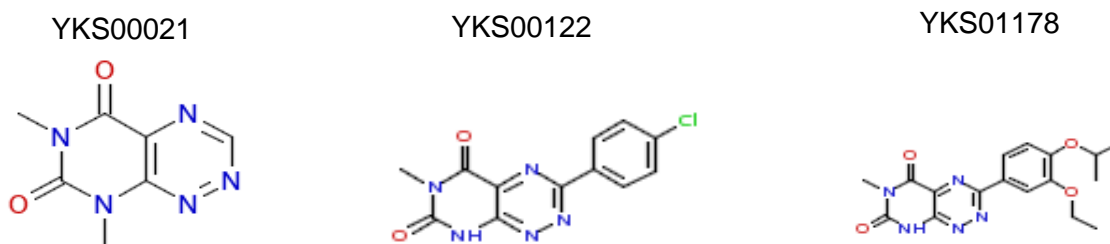


Abb. 4.23: Inhibitoren der Interaktion zwischen MBD2b und methylierter DNA

Die dargestellten drei Substanzen konnten mittels EMSA als effiziente Inhibitoren der MBD2b-DNA-Bindung identifiziert werden.

4.12 Isothermale Titrationskalorimetrie eines Inhibitors von MBD2b an methylierte DNA

Mit Hilfe eines EMSAs konnten drei effektive Inhibitoren der Bindung von MBD2b an das HtrA1-Oligonucleotid mit einem zentralen methylierten Cytosin identifiziert werden (4.11). Um zu testen, ob der effektivste Inhibitor YYS01178 (Abb. 4.23) an das MBD2b Protein oder das methylierte HtrA1-Oligonucleotid bindet, wurde die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) (3.2.3.7) verwendet.

Zunächst wurde die Bindung von YYS01178 an das rekombinant hergestellte MBD2b-Protein analysiert. Dazu wurde das Protein in ITC-Puffer gelöst, so dass eine Proteinendkonzentration von 10 μM vorlag. Zur Proteinlösung wurde eine 500 μM Lösung des Inhibitors in ITC-Puffer titriert. In Abb. 4.24 ist das Ergebnis der ITC dargestellt. Die Rohdaten konnten mit dem Modell für eine vorhandene Bindestelle gefittet werden. Dabei zeigte sich, dass es während der Messung zu keinen relevanten Wärmeänderungen gekommen ist. Dementsprechend hat der Ligand, wenn er zu der Proteinlösung hinzu getropft wurde, nicht an MBD2b gebunden.

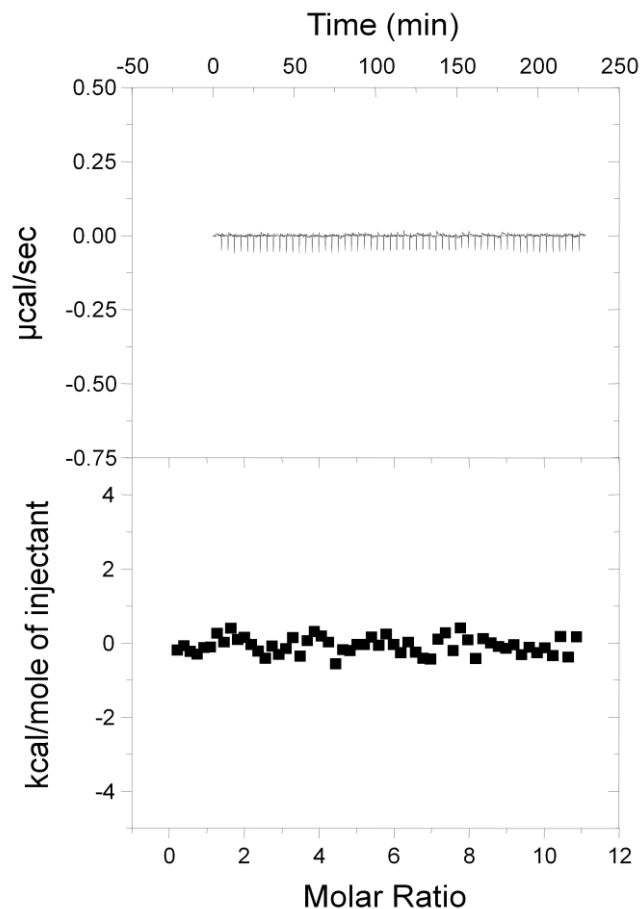


Abb. 4.24: Bindung von Substanz YKS00178 an MBD2b

Die Bindung von Substanz YKS00178 (500 μM) an MBD2b (10 μM) wurde mittels ITC analysiert.

Für die Analyse der Bindung von Substanz YKS001178 an das methylierte HtrA1-Oligonucleotid, wurde YKS00178 (Konzentration 500 μM in ITC-Puffer) zu der DNA (Konzentration 10 μM in ITC-Puffer) titriert. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 4.25 dargestellt. Die Rohdaten wurden mit dem Modell einer Bindungsstelle gefittet. Die daraus ermittelte Dissoziationskonstante (K_d) und die Bindungsenthalpie (ΔH) sind in Tabelle 4.1 angegeben. Die Dissoziationskonstante von 9,35 μM zeigt an, dass der Inhibitor in der Lage ist, an die DNA zu binden. Bei dieser Bindungsreaktion handelt es sich um eine stark endotherme Reaktion, da mit 1262 kcal/mol der Reaktion viel Energie zugeführt werden muss.

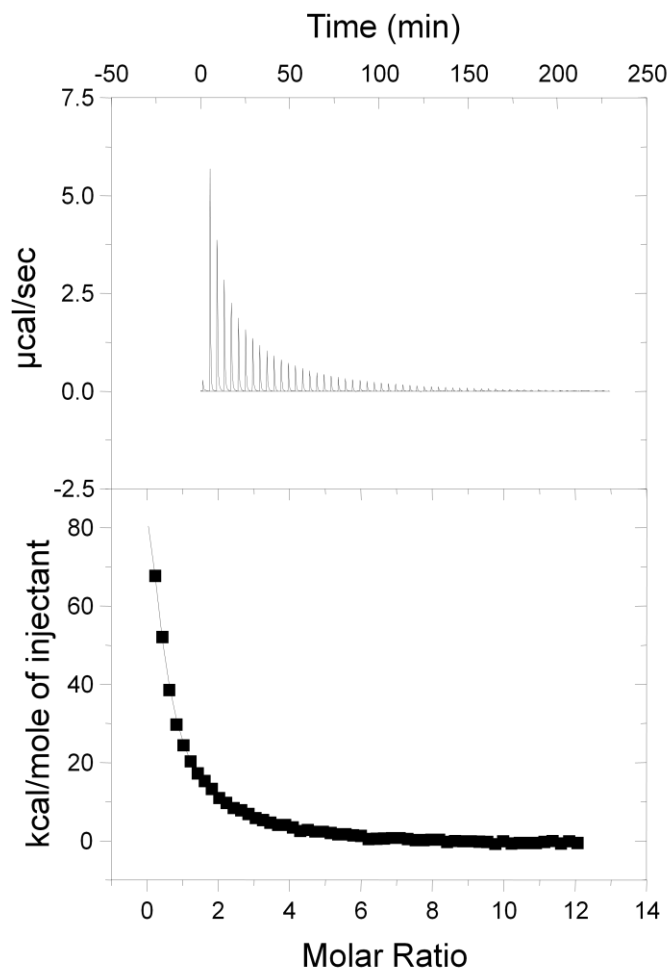


Tabelle 4.1: K_d und ΔH für die Bindung von Substanz YKS001178 an methylierte DNA

K_d	ΔH
9,35 μM	1262 kcal/mol

Abb. 4.25: Bindung von Substanz YKS00178 an das methylierte HtrA1-Oligonucleotid

Die Bindung von Substanz YKS00178 (500 μM) an das methylierte HtrA1-Oligonucleotid (10 μM) wurde mittels ITC analysiert.

4.13 Analyse der oligomeren Zustände von MBD2

4.13.1 Oligomerer Zustand von MBD2b in Abhängigkeit von der DNA-Bindung

Mit Hilfe der Gelfiltration soll untersucht werden, ob die Bindung von MBD2b an methylierte DNA den oligomeren Zustand des Proteins beeinflusst. Dazu wurde eine Superdex200-Gelfiltrationssäule verwendet. Diese wurde in einem Bereich von 158 kDa bis 669 kDa nach Herstellerangaben mit dem Gelfiltrationskalibrierungskit LMW & HMW kalibriert. Die dafür

verwendeten Proteine wiesen ein Molekulargewicht zwischen 6500 und 440000 Da auf. Nach der Kalibrierung wurden die Elutionsvolumina von MBD2b in An- und Abwesenheit von methylierter DNA bestimmt. Anhand der mittels Kalibrierung bestimmten Gleichung, die den Zusammenhang zwischen Elutionsvolumen und Molekulargewicht beschreibt, konnte das tatsächliche Molekulargewicht errechnet und der oligomere Zustand bestimmt werden.

Für die Gelfiltration wurden 250 µg MBD2b in Gelfiltrationspuffer gelöst und ggf. mit 60 µg HtrA1-Oligonucleotid (molares Verhältnis von MBD2b und DNA war 1:1) gemischt und luftblasenfrei auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Gelfiltrationsanalyse von MBD2b ergab das in Abb. 4.26 in dargestellte Elutionsprofil.

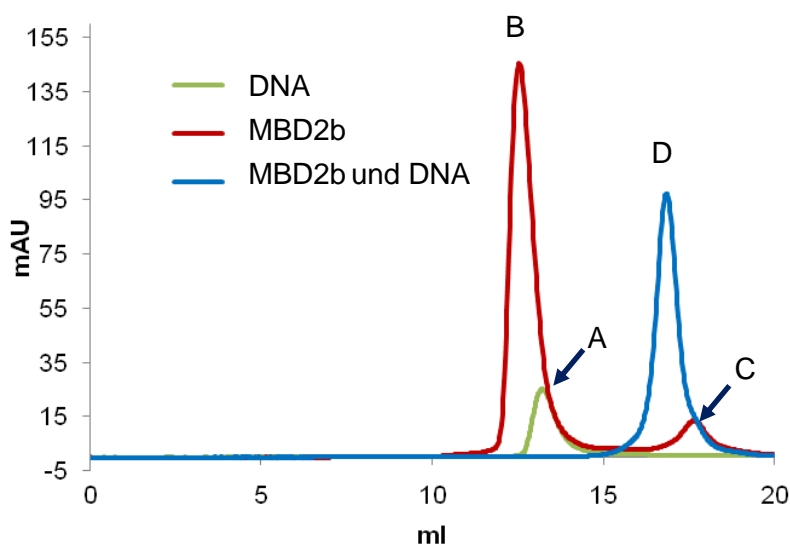


Abb. 4.26: Gelfiltrationsanalyse von MBD2b

MBD2b wurde in An- und Abwesenheit des 12 nt-langen methylierten HtrA1-Oligonucleotids mittels Gelfiltration analysiert.

Die Molekulargewichte der analysierten monomeren Makromoleküle sind in sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Erwartete Molekulargewichte des MBD2b, des HtrA1-Oligonucleotids und des Komplexes aus MBD2b und HtrA1-Oligonucleotid

	MW in Da
MBD2b	31489,7
HtrA1-Oligonucleotid	7313,0
MBD2b und HtrA1-Oligonucleotid (1:1)	38802,7

Anhand der erwarteten Molekulargewichte und der mittels Gelfiltrationsanalyse bestimmten Elutionsvolumina, die für die Berechnung der tatsächlichen Molekulargewichte

herangezogen wurden, konnten die oligomeren Zustände ermittelt werden (Tabelle 4.3). MBD2b lag in Abwesenheit des HtrA1-Oligonucleotids als Trimer vor (*Peak A*). Die Zugabe des DNA-Oligonucleotids führte zu einer leichten Erhöhung der Oligomerisierung (*Peak B*). Bei Bindung an DNA liegt MBD2b eher als Tetramer vor. Neben *Peak B* konnte noch einer weiterer *Peak* im niedermolekularen Bereich bestimmt werden (*Peak C*), der einem Molekulargewicht von 11316,62 Da entspricht. Zur Kontrolle wurde weiterhin eine Gelfiltrationsanalyse des DNA-Oligonucleotids in Abwesenheit von MBD2b durchgeführt. Die Analyse liefert einen *Peak* (*Peak D*) der rechnerisch dem oligomeren Zustand eines Dimers entspricht.

Tabelle 4.3: Oligomerisierung von MBD2b in Abhängigkeit von der Bindung an das methylierte HtrA1-Oligonucleotid

	errechnetes MW in Da	Oligomer
MBD2b	96426,60	3,1
HtrA1-Oligonucleotid	16596,80	2,3
MBD2b und HtrA1-Oligonucleotid (1:1)	134074,95	3,5

4.13.2 Oligomerer Zustand der MBD_{MBD2} in Abhängigkeit von der DNA-Bindung

Um zu untersuchen, ob die Methyl-CpG-bindende Domäne (MBD) von MBD2 eine Änderung der Oligomerisierung nach DNA-Bindung zeigt, wurde die Gelfiltrationsanalyse außerdem mit der DNA-bindenden Domäne von MBD2 durchgeführt. Für die Gelfiltration wurden 250 µg der MBD_{MBD2} und ggf. 156 µg DNA-Oligonucleotid (molares Verhältnis ist 1:1) in Gelfiltrationspuffer gemischt und luftblasenfrei auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Gelfiltrationsanalyse ergab das Abb. 4.27 in dargestellte Elutionsprofil.

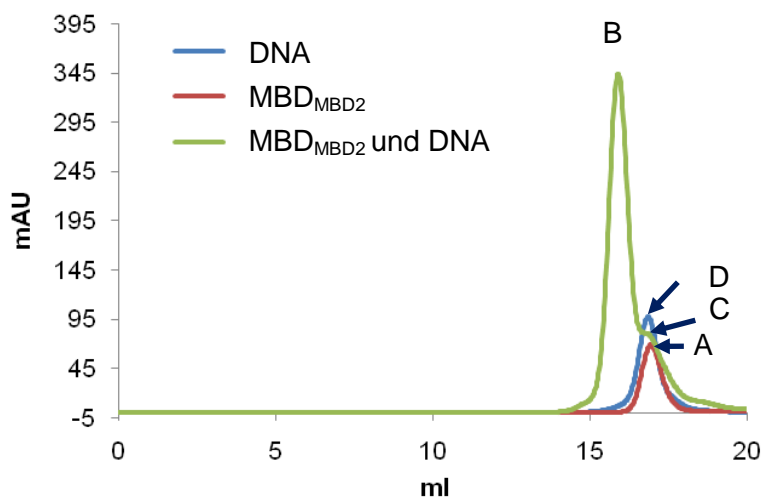


Abb. 4.27: Analytische Gelfiltration der MBD_{MBD2} in An- und Abwesenheit des HtrA1-Oligonucleotids

250 µg der MBD_{MBD2} mit und ohne 156 µg DNA-Oligonucleotid wurden mittels Gelfiltrationsanalyse hinsichtlich ihres Oligomerisierungszustands untersucht.

Die Molekulargewichte der analysierten monomeren Makromoleküle sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Erwartete Molekulargewichte der MBD_{MBD2}, des HtrA1-Oligonucleotids und des Komplexes aus MBD_{MBD2} und HtrA1-Oligonucleotid

	MW in Da
MBD_{MBD2}	11689,3
HtrA1-Oligonucleotid	7313,0
MBD_{MBD2} und HtrA1-Oligonucleotid (1:1)	19002,3

Mit Hilfe der erwarteten Molekulargewichte und der Elutionsvolumina wurden die Molekulargewichte bzw. oligomeren Zustände bestimmt (Tabelle 4.5). Ohne Zugabe des HtrA1-Oligonucleotids lag die MBD_{MBD2} als Monomer vor (*Peak A*). Die Zugabe des HtrA1-Oligonucleotids führte zu keiner Änderung der Oligomerisierung (*Peak B*). Der Komplex aus MBD_{MBD2} und HtrA1-Oligonucleotid liefert noch einen weiteren kleineren *Peak* (*Peak C*), dessen Elutionsvolumen dem des HtrA1-Oligonucleotids (*Peak D*) und demnach vermutlich ungebundener DNA entspricht.

Tabelle 4.5: Oligomerisierung der MBD_{MBD2} in Abhängigkeit von der Bindung an das methylierte HtrA1-Oligonucleotid

	errechnetes MW	Oligomer
MBD_{MBD2}	15888,31	1,4
HtrA1-Oligonucleotid	16596,80	2,3
MBD_{MBD2} und HtrA1-Oligonucleotid (1:1)	26303,55	1,4

4.14 Proteolyse von MBD2b

4.14.1 Proteolyse von MBD2b durch HtrA1

Um zu untersuchen, ob MBD2b ein Substrat von HtrA1 ist, wurden die beiden Proteine zunächst gereinigt. Dann wurde rekombinant hergestelltes MBD2b mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinantem HtrA1 (die Reinigung von HtrA1 wurde von Dr. Annette Tennstädt etabliert und durchgeführt) in Reaktionspuffer inkubiert. Dabei wurde eine verkürzte Form von HtrA1 verwendet, der die N-terminale Mac25-Domäne fehlt, und die auch *in vivo* nachgewiesen werden konnte (Chien *et al.* 2006).

Zunächst wurde MBD2b mit Reaktionspuffer gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde weitere 10 min bei 37°C inkubiert, bevor das HtrA1 hinzugegeben wurde. Es wurden verschiedene Substrat:Enzymverhältnisse untersucht. Die Proteolysereaktion wurde nach 1 h und 3 h durch Zugabe von SDS-Ladepuffer und Erhitzen auf 95°C für 5 min gestoppt. Die Produkte der Proteolysereaktion wurden mittels SDS-PAGE (12%-Gel) und Coomassie Blau-Färbung analysiert.

Das Ergebnis der Proteolyse ist in Abb. 4.28 dargestellt und zeigt, dass MBD2b ein Substrat von HtrA1 ist. Bereits nach einstündiger Inkubation war ein deutlicher Abbau von MBD2 für alle getesteten Substrat:Enzymverhältnisse zu erkennen. Die Zugabe geringer Mengen an HtrA1 und die kürzere Inkubation lieferten zunächst zwei prominente Abbaubanden im Bereich von 15 kDa und eine weitere schwächere Bande in diesem MW-Bereich. Mit steigenden HtrA1-Konzentrationen wurden diese Banden vollständig proteolysiert. Eine Steigerung der HtrA1-Menge führte außerdem zur Bildung von Abbauprodukten im Bereich von 10 kDa.

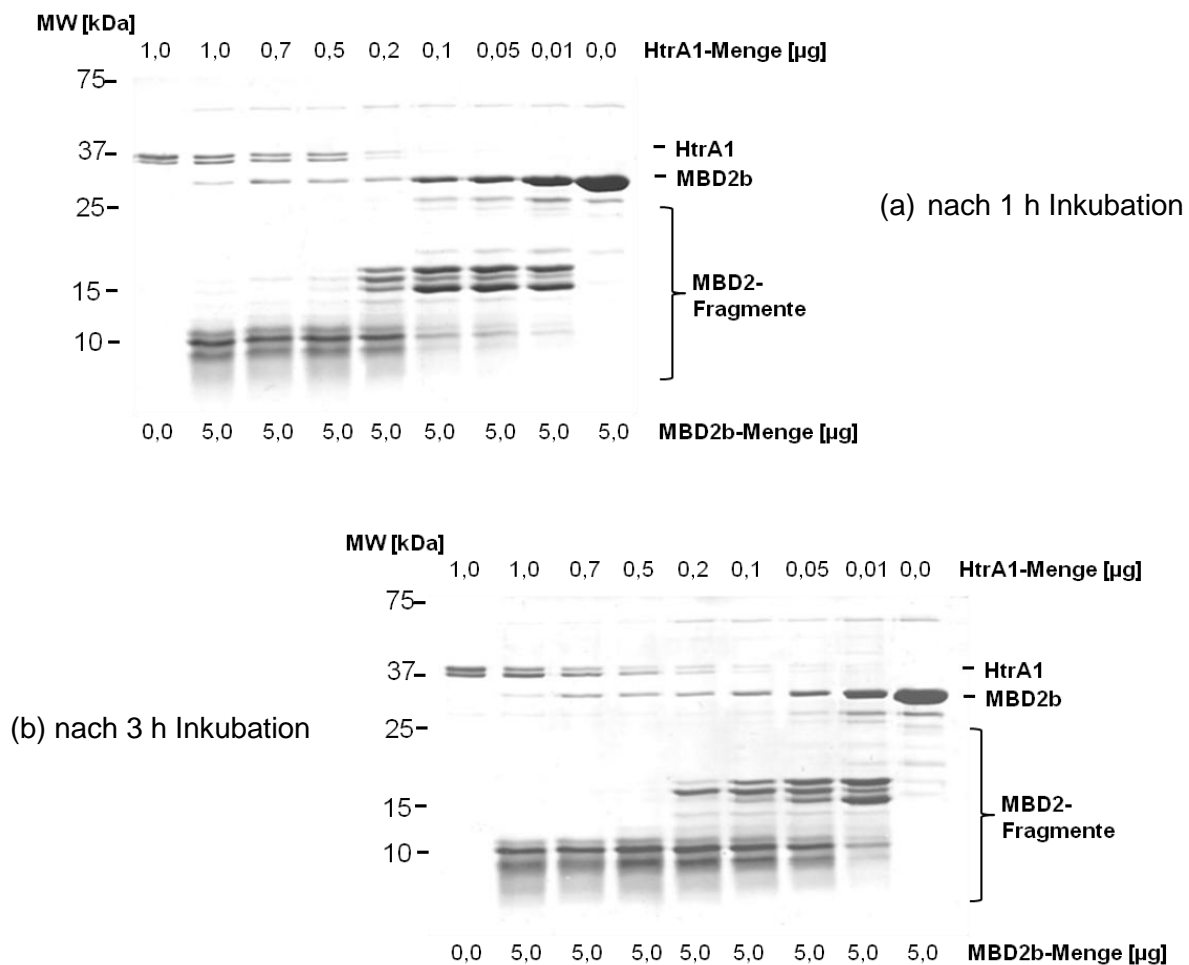


Abb. 4.28: Proteolyse von MBD2b durch HtrA1

5 µg MBD2b wurden mit verschiedenen Konzentrationen an HtrA1 in 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 8,0 bei 37°C für 1 h (a) und 3 h (b) inkubiert. Die Analyse der Proteolyseprodukte erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung.

4.14.2 Proteolyse von MBD2b durch HtrA1 in Anwesenheit methylierter DNA

Die Inkubation von MBD2b mit steigenden Konzentrationen an HtrA1 führte bereits nach 1 h zur Entstehung von Abbauprodukten (4.14.1). MBD2b stellt demnach ein Substrat von HtrA1 dar. Um zu analysieren, ob die Bindung von MBD2b an methylierte DNA Einfluss auf die Proteolyse durch HtrA1 hat, wurde MBD2b zunächst mit dem methylierten HtrA1-Oligonucleotid in Reaktionspuffer im molaren Verhältnis von 1:1 gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde dann weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Mengen an HtrA1 hinzugegeben. Die weitere Vorgehensweise entspricht der in Abschnitt 4.14.1.

In Abb. 4.29 ist das Ergebnis der Proteolyse von MBD2b, das an das HtrA1-Oligonucleotid gebunden ist, dargestellt. Das Proteolysemuster des gebundenen MBD2b ähnelt dem des freien MBD2b. Bei geringen Mengen an HtrA1 entstanden zunächst Fragmente im Bereich von 15 kDa, eine Steigerung der HtrA1-Menge führte zur Entstehung von Banden im Bereich von 10 kDa. Die Bande bei 15 kDa, die in Abwesenheit von methylierter DNA komplett abgebaut wurde, wurde nach DNA-Bindung deutlich langsamer proteolysiert.

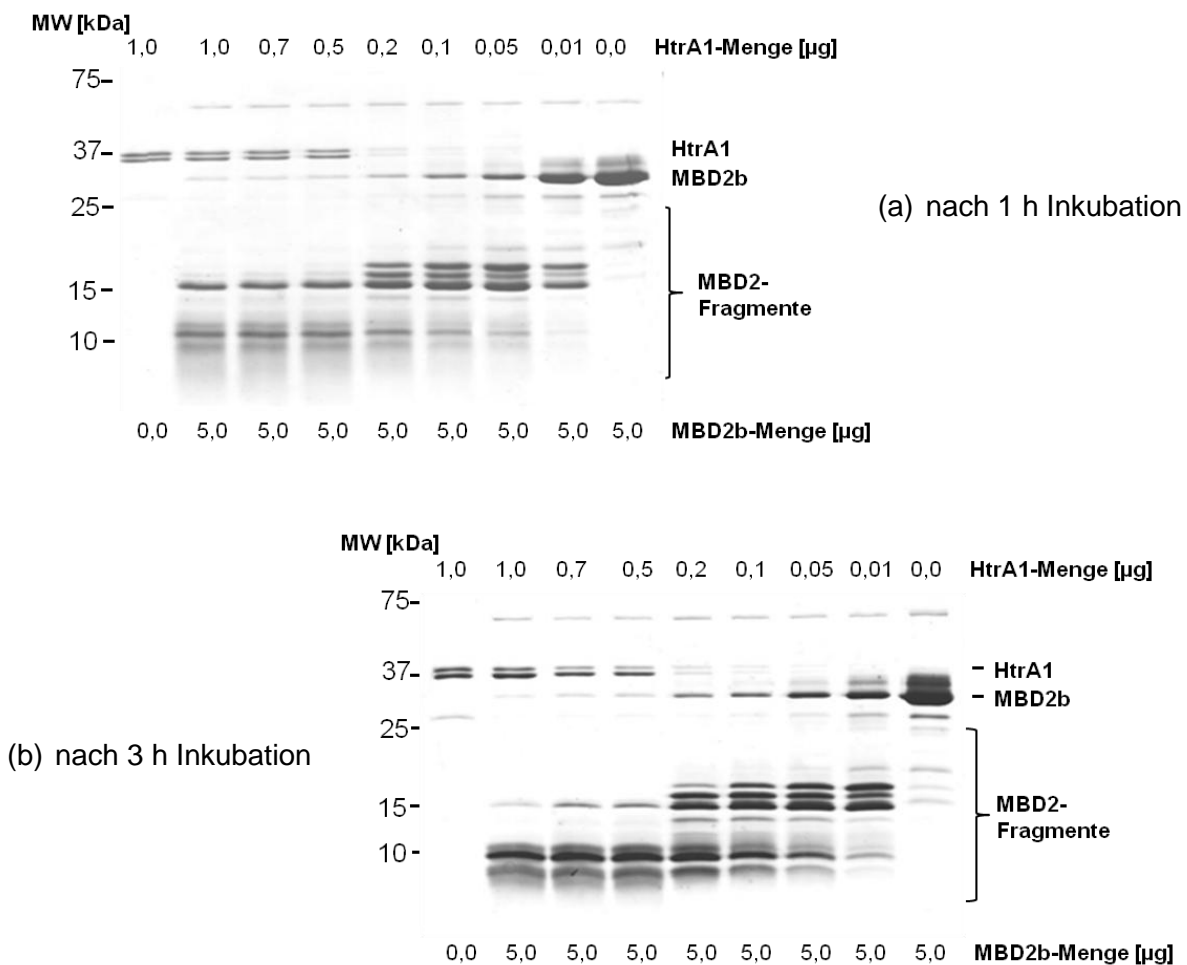


Abb. 4.29: Proteolyse des an methylierte DNA gebundenen MBD2b durch HtrA1

5 µg MBD2b wurden dem HtrA1-Oligonucleotid und verschiedenen Konzentrationen an HtrA1 in 50 mM Tris, 5 mM MgCl_2 , pH 8,0 bei 37°C für 1 h (a) und 3 h (b) inkubiert. Die Analyse der Proteolyseprodukte erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung.

4.14.3 Massenspektrometrische Analyse eines Produktes der MBD2b-Proteolyse

HtrA1 ist in der Lage ungebundenes MBD2b und MBD2b, welches an DNA gebunden ist, abzubauen (4.14.2). Die Analyse der Proteolyseprodukte ergab, dass bei der Proteolyse des DNA-gebundenen MBD2b-Proteins eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 15 kDa langsamer abgebaut wurde, als bei der Proteolyse des freien MBD2b (4.14.2). Um die Identität dieser Bande zu bestimmen, wurde sie mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten. Nach einem Trypsinverdau wurden die Peptide innerhalb der Bande mittels LC-ESI-MS (*Liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry*) identifiziert. Die massenspektrometrische Analyse wurde von Dr. Urs Lewandrowski, Institute for Analytical Sciences in Dortmund, durchgeführt. Dabei konnte folgendes Peptid identifiziert werden:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAS**DCPALPPGWKKEEVIRKSGLSAG**
KSDVYFSPSGKKFRSKPQLARYLGNTVDLSSFDERTGKMMPSKLQK
NKQRLRNDPLNQNKGPDLNTTLPIRQT

Abb. 4.30: Ergebnis der LC-ESI-MS-Analyse

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des Peptids, welches mittels LC-ESI-MS in der analysierten SDS-Gel-Bande identifiziert wurde. Die blauen Buchstaben entsprechen der MBD des MBD2b-Proteins.

Das identifizierte Peptid entspricht den Aminosäuren 1 bis 121 des rekombinant hergestellten MBD2b-Proteins, welches insgesamt eine Länge von 284 Aminosäuren aufweist. Zwischen Aminosäure 24 und 86 ist die Methyl-CpG-bindende Domäne (MBD) von MBD2b lokalisiert.

4.14.4 Bestimmung der HtrA1-Schnittstellen innerhalb des MBD2b-Proteins

MBD2b kann von HtrA1 sowohl in ungebundener Form als auch nach Bindung an methylierte DNA, abgebaut werden. Analysiert man die Proteolyseprodukte mittels SDS-PAGE, erkennt man, dass eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 15 kDa etwas schlechter abgebaut wird, wenn MBD2b an DNA gebunden ist (4.14.2). Mit Hilfe der Massenspektrometrie sollten daher die Schnittstellen von HtrA1 innerhalb des freien bzw. des DNA-gebundenen MBD2b-Proteins untersucht werden. Dazu wurden 5 µg MBD2b mit

1 µg HtrA1 und gegebenenfalls mit 1,25 µg unter den in 4.14.1 und 4.14.2 erwähnten Bedingungen für 3 h inkubiert. Diese Proteolyseansätze wurden für die massenspektrometrische Analyse verwendet, die von Dr. Urs Lewandrowski, Institute of Analytical Sciences, Dortmund, durchgeführt wurden. Für die Analyse wurden die Ansätze zunächst mittels HPLC anhand ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Die Peptide wurden dann direkt in einem *Orbitrap*-Massenspektrometer ionisiert und vermessen. Die Auswertung der Peptide ergab folgende Schnittstellen innerhalb des MBD2b-Proteins (Abb. 4.31):

MBD2b gebunden an das HtrA1-Oligonucleotid					
001	MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MASDCPALPP	GWKKEEVIRK	SGLSAGKSDV
051	YYFSPSGKKF	RSKPQLARYL	GNTVDLSSFD	FRTGKMMPSK	LQKNKQRLRN
101	DPLNQNGKGP	DLNNTLPIRQ	TASIFKQPVT	KVTNHPSNKV	KSDPQRMNEQ
151	PRQIFWEKRL	QGLSASDVTE	QIIKTMELPK	GLQGVGPGSN	DETLISAVAS
201	AIHTSSAPIT	GQVSAAVEKN	PAVAINTSQP	LCKAFIVTDE	DIRKQEERVQ
251	QVRKKLEEAL	MADIISRAAD	TEEMDIEMDS	GDEA	

freies MBD2b					
001	MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MASDCPALPP	GWKKEEVIRK	SGLSAGKSDV
051	YYFSPSGKKF	RSKPQLARYL	GNTVDLSSFD	FRTGKMMPSK	LQKNKQRLRN
101	DPLNQNGKGP	DLNNTLPIRQ	TASIFKQPVT	KVTNHPSNKV	KSDPQRMNEQ
151	PRQIFWEKRL	QGLSASDVTE	QIIKTMELPK	GLQGVGPGSN	DETLISAVAS
201	AIHTSSAPIT	GQVSAAVEKN	PAVAINTSQP	LCKAFIVTDE	DIRKQEERVQ
251	QVRKKLEEAL	MADIISRAAD	TEEMDIEMDS	GDEA	

Abb. 4.31: Übersicht der HtrA1-Schnittstellen innerhalb des MBD2b-Proteins

5 µg gereinigtes MBD2b-Protein wurden mit 1 µg HtrA1 und gegebenenfalls 1,25 µg HtrA1-Oligonucleotid für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Schnittstellen, die mit einem grünen Haken markiert sind, wurden sowohl für das freie, als auch für das DNA-gebundene MBD2b detektiert. Die roten Haken markieren Schnittstellen, die jeweils nur bei dem gebundenen bzw. freien MBD2b ermittelt werden konnten. Die MBD-Domäne ist blau markiert, das putative *coiled coil*-Motiv ist grau markiert.

Die Auswertung der Schnittstellen hat ergeben, dass beide MBD2b-Varianten zahlreiche HtrA1-Schnittstellen aufweisen. Das freie MBD2b wurde insgesamt 58mal geschnitten, das an DNA gebundene MBD2b 63mal. Die Schnittmuster weisen außerdem einige Unterschiede auf. Die gebundene Form von MBD2b wurde an 13 Schnittstellen geschnitten, die in der ungebundenen Form nicht gespalten wurden. Interessanterweise befinden sich drei dieser exklusiven Schnittstellen innerhalb der MBD. Die ungebundene Form von MBD2b hat neun zusätzliche Schnittstellen.

Insgesamt schneidet HtrA1 im N-terminalen Bereich, wo sich die MBD befindet, seltener als in der C-terminalen Region. Auffällig ist außerdem, dass HtrA1 sehr häufig innerhalb der putativen *coiled coil*-Domäne von MBD2 schneidet.

Um die Präferenz von HtrA1 für einzelne Aminosäuren zu analysieren, wurde bestimmt, wie oft HtrA1 nach einer bestimmten Aminosäure schneidet. Die ermittelten Häufigkeiten in Tabelle 4.6 zeigen, dass HtrA1 eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren hat, da es bevorzugt nach Alanin, Leucin und Valin schneidet.

Tabelle 4.6: Anzahl der ermittelten HtrA1-Schnittstellen nach den einzelnen Aminosäuren in MBD2b

Anzahl der Schnittstellen		Aminosäure
10	7	Alanin
10	11	Leucin
7	8	Valin
7	7	Serin
6	7	Threonin
4	2	Asparaginsäure
4	4	Glutamin
3	1	Asparagin
3	2	Methionin
2	1	Isoleucin
1	1	Prolin
1	1	Tryptophan
1	0	Glycin
1	2	Lysin
1	2	Phenylalanin
1	1	Arginin
1	1	Tyrosin
MBD2b an DNA gebunden	ungebundenes MBD2b	

4.15 Re-Expression von HtrA1 in Kolonkarzinomzellen

Die Expression von HtrA1 ist in verschiedenen Tumorarten herunter reguliert (Shridhar *et al.* 2002, Bowden *et al.* 2006, Baldi *et al.* 2002, Baldi *et al.* 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die HtrA1-Expression in HCT116-Zellen ebenfalls stark vermindert ist (4.2). Außerdem ist der HtrA1-Promotor in HCT116-Zellen hypermethyliert (4.4). Die HtrA1-Expression soll in diesen Zellen durch viralen Gentransfer wiederhergestellt werden, um anschließend den Einfluss der Re-Expression von HtrA1 auf verschiedene zelluläre Mechanismen, die für die Tumorprogression von Bedeutung sind, zu untersuchen.

4.15.1 Retroviraler Gentransfer von HtrA1 in HCT116-Zellen

Die HtrA1-Expression in HCT116-Zellen sollte mittels viraler Transduktion wiederhergestellt werden (3.2.2.5). Dazu wurden 293T-Verpackungszellen mit einem retroviralen HtrA1-Vektor und den entsprechenden Hilfsvektoren transfiziert. Nach erfolgreicher Transfektion wurde die Virionen-Produktion der Zellen angeregt. Der virushaltige Überstand wurde für die Infektion der HCT116-Zellen verwendet (3.2.2.6). Durch Antibiotika-Behandlung wurden die erfolgreich transduzierten Zellen selektioniert (3.2.2.7).

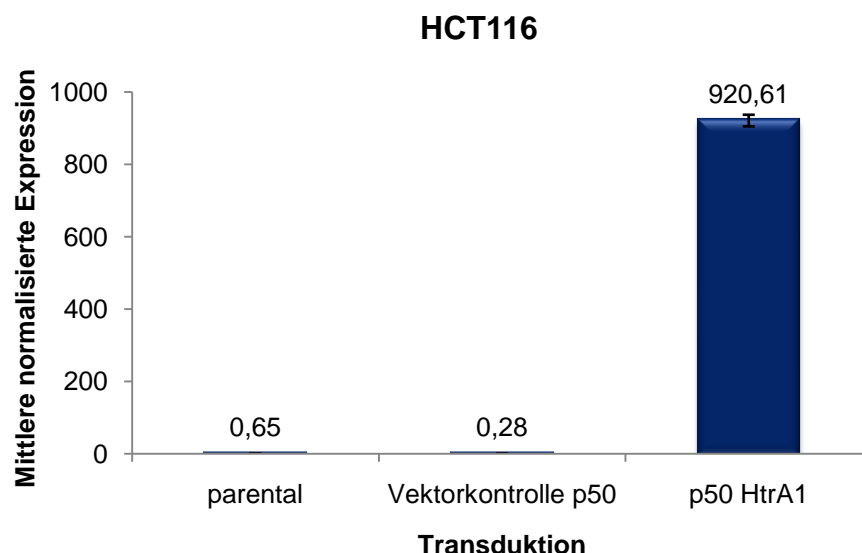


Abb. 4.32: HtrA1-Expression in HCT116-Zellen nach viraler Transduktion von HtrA1

Die HtrA1-Expression wurde mittels QPCR-Analyse bestimmt.

Mit Hilfe der QPCR-Analyse wurde die Expression von HtrA1 nach Transduktion der Zellen untersucht (3.2.2.13). Das Ergebnis der QPCR-Analyse ist in Abb. 4.32 dargestellt. Sie zeigt, dass mit Hilfe des viralen Gentransfers eine starke Re-Expression von HtrA1 im Vergleich zu

den parental HCT116-Zellen und den mit dem Leervektor transduzierten Zellen erreicht werden konnte.

4.15.2 Subzelluläre Lokalisation von HtrA1 nach Re-Expression in HCT116

Frühere Studien haben gezeigt, dass HtrA1 sowohl intrazellulär als auch extrazellulär lokalisiert ist (Grau *et al.* 2005). Mit Hilfe der Konfokalen-Laser-Raster-Mikroskopie soll die zelluläre Lokalisation von HtrA1 nach Re-Expression mittels viraler Transduktion in HCT116-Zellen untersucht werden. Dafür wurden die Zellen auf Objektträgern ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen wurde diese fixiert, gefärbt und mikroskopisch untersucht (3.2.2.12).

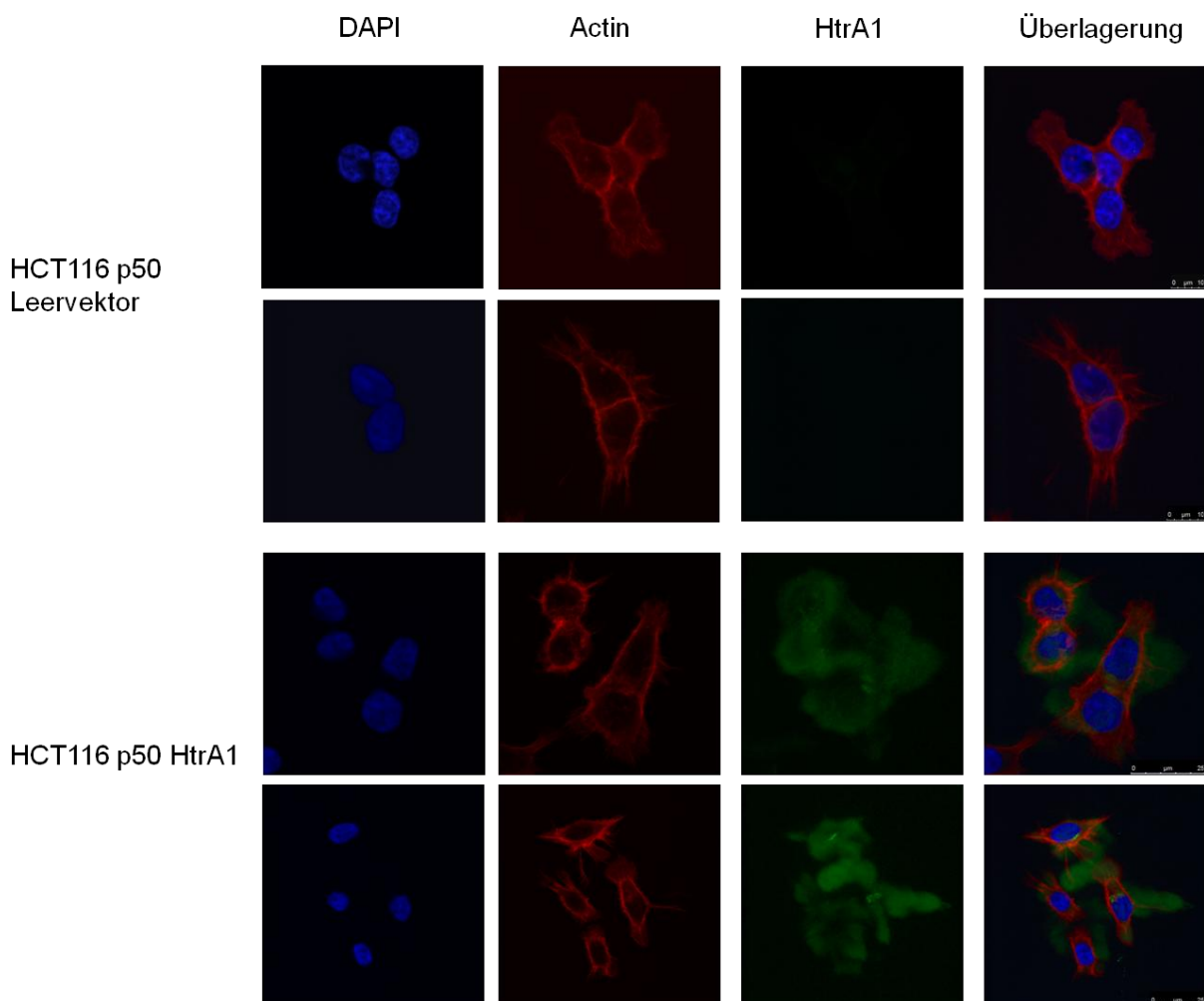


Abb. 4.33: Lokalisation von HtrA1 in HCT116-Zellen

HCT116-Zellen wurden fixiert und gefärbt. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt (blau), HtrA1 mit einem HtrA1-Antikörper und einem Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) und das Actincytoskelett mit einem TRITC-markierten Phalloidinfarbstoff (rot). Die Untersuchung der Zellen erfolgte mittels Konfokaler-Laser-Raster-Mikroskopie.

Die mikroskopische Untersuchung der HCT116-Zellen hat ergeben, dass die Überexpression von HtrA1 nicht nur auf RNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene beobachtet werden kann. Bei den HCT116-Zellen, die mit dem viralen Levektor transduziert wurden, war keine HtrA1-Proteinexpression nachweisbar, nach viraler Transduktion war jedoch eine starke HtrA1-Proteinexpression zu beobachten. HtrA1 war sowohl innerhalb der Zelle als auch außerhalb der Zelle lokalisiert, wobei der Großteil außerhalb der Zelle zu beobachten war. Die Verteilung des HtrA1-Proteins war intrazellulär und extrazellulär sehr diffus.

4.15.3 Migrationsverhalten von HCT116-Zellen nach Rekonstitution der HtrA1-Expression

Die HtrA1-Protease ist sowohl intrazellulär als auch extrazellulär lokalisiert (Grau *et al.* 2005). In HCT116-Zellen ist die Expression von HtrA1 auf RNA- und Proteinebene inhibiert. Durch viralen Gentransfer kann sie jedoch wiederhergestellt werden (4.15.1). Nach Re-Expression von HtrA1 ist die Protease intrazellulär und extrazellulär lokalisiert (4.15.2). Um zu untersuchen, ob die Re-Expression von HtrA1 das Migrationsverhalten der Zellen beeinflusst, soll die Motilität der Zellen mit verschiedenen Methoden untersucht werden.

4.15.3.1 Wundheilungs-Assay mit HCT116-Zellen nach Wiederherstellung der HtrA1-Expression

Um das Migrationsverhalten der HCT116-Zellen nach Re-Expression von HtrA1 zu untersuchen, wurde ein Wundheilungs-Assay durchgeführt (3.2.2.9). Dafür wurden die Zellen auf einer 24-Kavitäten-Platte ausgesät und inkubiert, bis eine geschlossene Zellschicht entstanden war. Dann wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze eine Wunde erzeugt. Das Schließen der Wunde wurde mikroskopisch beobachtet. In Abb. 4.34 ist das Ergebnis dargestellt.

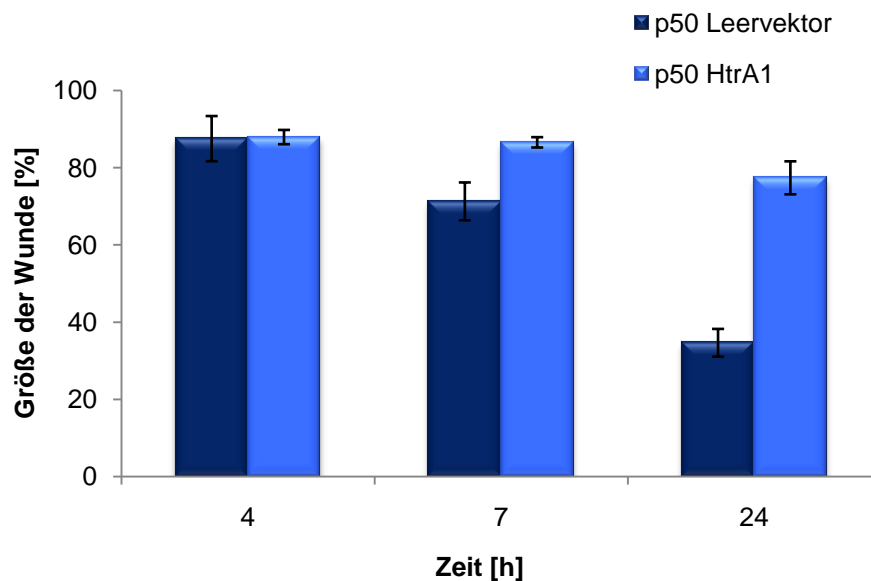


Abb. 4.34: Wundheilungs-Assay mit HCT116-Zellen nach Re-Expression von HtrA1

Für jede Zelllinie wurde die Geschwindigkeit der Wundheilung für drei Wunden ausgewertet. Es sind jeweils der Mittelwert aus den Dreifachbestimmungen und die Standardabweichung angegeben.

Mit Hilfe des Wundheilungs-Assays konnten Unterschiede hinsichtlich des Migrationsverhaltens der HCT116-Zellen nach Re-Expression von HtrA1 festgestellt werden. Nach 4 h waren die Wunden sowohl bei HCT116 p50 Leervektor und bei HCT116 p50 HtrA1 noch gleich groß. Nach 7 h und nach 24 h ist jedoch die Wunde bei den Zellen mit rekonstituierter HtrA1-Expression deutlich größer. Die Zellen migrieren demnach langsamer im Vergleich zu den HCT116-Zellen, in denen keine HtrA1-Expression nachweisbar ist.

4.15.3.2 3D-Migrations-Assay mit HCT116-Zellen nach Wiederherstellung der HtrA1-Expression

Der Wundheilungs-Assay mit HCT116-Zellen, in denen die Expression von HtrA1 wiederhergestellt wurde, hat ergeben, dass die HtrA1-exprimierenden Zellen langsamer migrieren als die Kontrollzellen (Abb. 4.34). Der Wundheilungs-Assay ermöglicht jedoch ausschließlich die Untersuchung des zweidimensionalen Migrationsverhaltens. Die dreidimensionale Migration sollte daher mit Hilfe einer weiteren Methode, die auf dem Prinzip der Boyden-Kammer basiert, untersucht werden (3.2.2.10). Die Zellen wurden dafür auf einer porösen Membran ausgesät und für 7 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen, die durch die Membran migriert sind, bestimmt. Dazu wurden die Zellkerne mittels DAPI gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

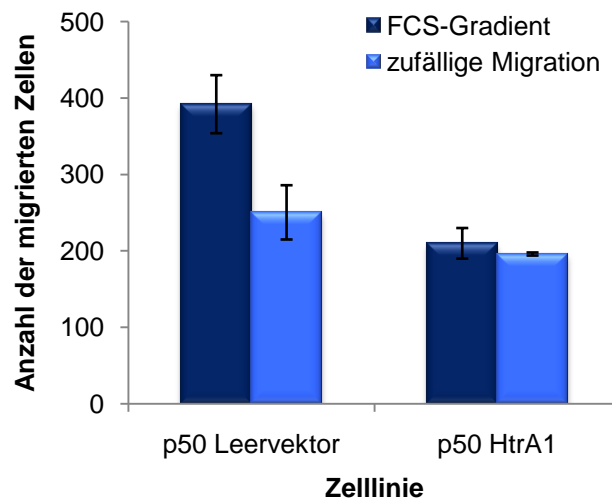


Abb. 4.35: 3D-Migrations-Assay mit HCT116-Zellen nach Re-Expression von HtrA1

Die Zellen wurden auf einer porösen Membran ausgesät. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde nach 7 h bestimmt. Für jede Zelllinie wurden zwei Membraneinsätze ausgezählt. Dabei wurden pro Membran neun Sichtfelder ausgezählt. Es sind jeweils der Mittelwert aus den Mehrfachbestimmungen und die Standardabweichung angegeben.

Mit Hilfe des Assays wurden die zufällige und die chemotaktische Migration untersucht. Bei Analyse der Chemotaxis wurde in die Kavität Medium mit 10% FCS gegeben. Innerhalb des Membraneinsatzes betrug die FCS-Konzentration nur 1%. Für die Untersuchung der zufälligen Migration lag die FCS-Konzentration im Membraneinsatz, und in der Kavität bei 1%. Das Ergebnis des dreidimensionalen Migrations-Assays ist in Abb. 4.35 dargestellt.

Der FCS-Gradient zwischen Kavität und Membraneinsatz führte zu einer um 1,6fach gesteigerten Migrationsrate bei den HCT116 p50 Leervektor-Zellen. Die Erhöhung der FCS-Konzentration führte bei HtrA1-exprimierenden Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der Migration.

Der Vergleich der Anzahl an migrierten HCT116 p50 Leervektor-Zellen mit der an HCT116 p50 HtrA1-Zellen bei Bestehen des FCS-Gradienten zeigte eine um das 1,9fache verminderte Zellanzahl bei den HCT116 p50 HtrA1-Zellen. Ohne FCS-Gradient war die Anzahl der migrierten HCT116 p50 HtrA1-Zellen um das 1,3fache reduziert.

Die Re-Expression von HtrA1 in HCT116-Zellen inhibiert demnach die chemotaktische und zufällige Zellmigration. Bei fehlender HtrA1-Expression führt die Erhöhung der FCS-Konzentration zu einer gesteigerten Migrationsrate, bei rekonstituierter HtrA1-Expression nicht.

4.15.4 Apoptose in HCT116-Zellen nach Rekonstitution der HtrA1-Expression

Über die Funktion von HtrA1 in der Zelle ist bisher wenig bekannt. Mit Hilfe eines Apoptose-Assays soll untersucht werden, ob HtrA1 in die Regulation der Apoptose involviert ist. Dazu wurden HCT116-Zellen mit rekonstituierter HtrA1-Expression und Kontrollzellen mit den folgenden Substanzen, die in Zellen Apoptose induzieren können, behandelt. Nocodazol vermittelt die Depolymerisation der Mikrotubuli. Es induziert Apoptose durch Arretierung der Zellen in der Mitose (Vasquez *et al.* 1997). Taxol interferiert ebenfalls mit der normalen Funktion der Mikrotubuli. Es stabilisiert die Mikrotubuli und verhindert so deren Reorganisation während der Zellteilung (Kumar 1981). Es induziert außerdem die Apoptose durch Bindung an Bcl-2 (Blagosklonny *et al.* 1996). Cisplatin löst die Apoptose durch Bildung von Quervernetzungen innerhalb der DNA aus (Rosenberg 1973). Camptothecin besitzt cytotoxische Funktion, da es die DNA-Topoisomerase I inhibiert (Wall, Wani & Taylor 1976).

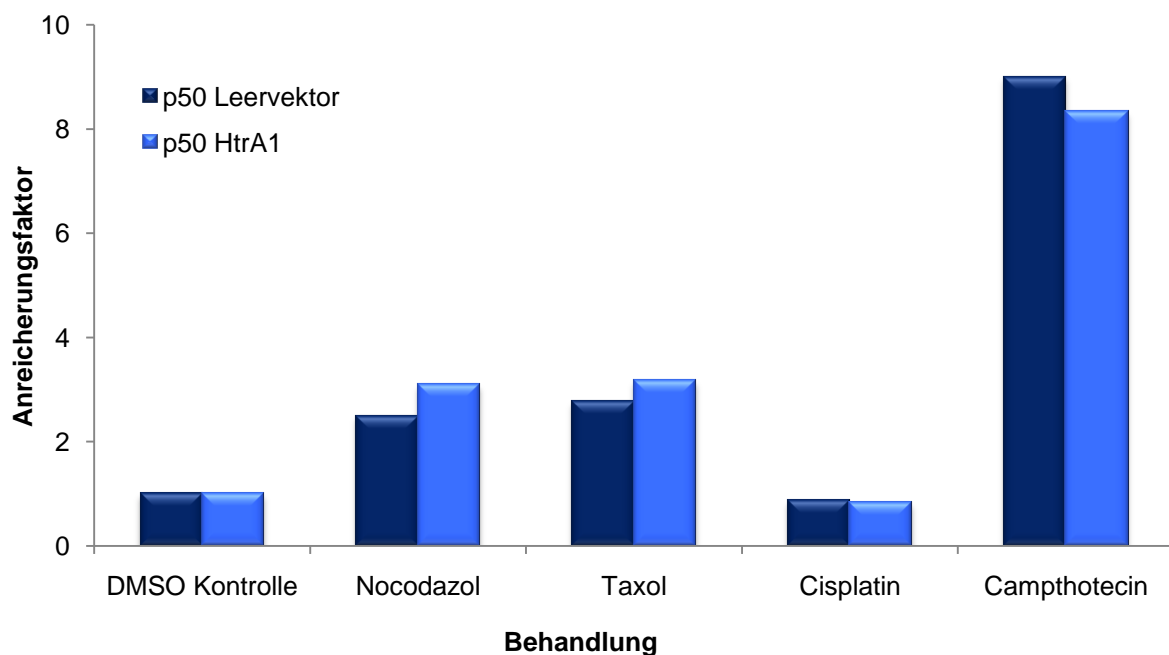


Abb. 4.36: Apoptose-Assay mit HCT116-Zellen nach Rekonstitution der HtrA1-Expression

Die Zellen wurden mit verschiedenen Apoptose-induzierenden Substanzen behandelt. Anschließend wurde die Apoptoserate anhand der Anreicherung der Nucleosomen im Cytoplasma der behandelten Zellen bestimmt.

Die Zellen wurden für 18 h mit 4 µg/ml Camptothecin, 30 µM Cisplatin, 0,25 µg/ml Nocodazol oder 1 µM Taxol behandelt. Anschließend wurde der Apoptose-Assay, der auf dem Prinzip eines *Sandwich-Enzym-Immunoassay* basiert, durchgeführt (3.2.2.8). Er

ermöglicht die spezifische Bestimmung von Mononucleosomen und Oligonucleosomen in der cytoplasmatischen Fraktion der Zelllysate. Das Ergebnis des Apoptose-Assays ist in Abb. 4.36 dargestellt.

Hinsichtlich der Apoptose konnten keine Unterschiede zwischen HCT116 p50 Leervektor-Zellen und HCT116 p50 HtrA1-Zellen festgestellt werden. Für die Apoptoseinduktion wurden verschiedene Chemikalien verwendet, die über unterschiedliche Mechanismen den programmierten Zelltod auslösen. Unabhängig vom Apoptosemechanismus waren jedoch keine Unterschiede zu erkennen. Die Behandlung der Zellen mit Cisplatin führte unter den gewählten Bedingungen nicht zur Apoptose.

4.16 Xenograft-Modell

Die generierten Zelllinien sollten im Hinblick auf ihr tumorbildendes Potential *in vivo* charakterisiert werden. Um den Einfluss von HtrA1 auf die Tumorprogression zu untersuchen, wurde der Verlauf des Tumorwachstums nach subkutaner Injektion der HtrA1-rekonstituierten HCT116-Zellen in Nacktmäusen untersucht und mit dem der Leervektor-transduzierten Kontrollzellen verglichen. Die Mausexperimente wurden in der Arbeitsgruppe Schuler, Universitätsklinikum Essen, durchgeführt. Nach Injektion der Zellen wurde die Größe der Tumore regelmäßig bestimmt und dokumentiert.

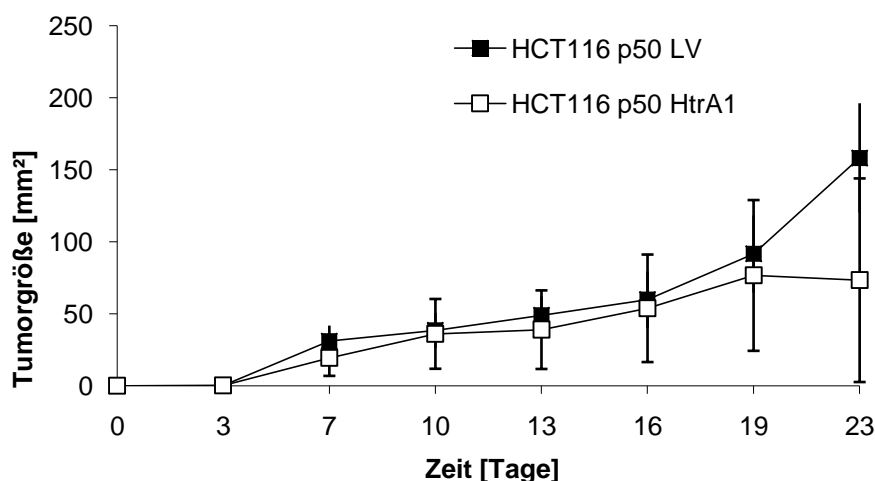


Abb. 4.37: Tumorwachstum nach subkutaner Injektion der HCT116-Zellen mit und ohne HtrA1-Expression in Nacktmäuse

Um *in vivo* zu untersuchen, welchen Einfluss die HtrA1-Expression auf die Tumorbildung hat, wurde der Verlauf des Tumorwachstums nach subkutaner Injektion der Zellen in Nacktmäuse beobachtet.

Für das Experiment wurden 5×10^6 -Zellen in die Flanken von NOD/SCID-Mäusen subkutan injiziert. Die Tumorgröße wurde etwa alle drei Tage zweidimensional mit Hilfe einer Schiebelehre bestimmt. Der Tumorverlauf ist in Abb. 4.37 dargestellt.

In Abb. 4.37 ist zu erkennen, dass das Tumorwachstum bis Tag 19 keine Unterschiede zwischen den HCT116 p50 Leervektorzellen und den HCT116 p50 HtrA1-Zellen zeigt. Aufgrund der zu hohen Tumorlast für die Mäuse ab Tag 23 musste der Versuch abgebrochen werden. An Tag 23 ist die mittlere Größe der Tumore, die nach Injektion der HCT116 p50 HtrA1-Zellen entstanden sind, um Faktor 2,2 kleiner. Dieser Unterschied ist jedoch, wie an der hohen Standardabweichung zu erkennen ist, nicht signifikant.

5 Diskussion

5.1 Die HtrA1-Genexpression ist epigenetisch reguliert

Die Expression von HtrA1 ist in verschiedenen Tumorarten herunter reguliert (Shridhar *et al.* 2002, Bowden *et al.* 2006, Baldi *et al.* 2002, Baldi *et al.* 2008). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Mechanismus, der für die Repression der HtrA1-Genexpression verantwortlich ist, identifiziert werden.

Die Expression von Genen wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Auf Ebene der Epigenetik beeinflussen die DNA-Methylierung und die Modifikation distinkter Aminosäurereste von Histon-Proteinen die Genexpression. Um Anhaltspunkte für die Regulation des HtrA1-Gens zu bekommen, wurde eine *in silico*-Analyse der Promotorregion durchgeführt, um potentielle *CpG islands* innerhalb der Promotorregion zu identifizieren. Die Analyse zeigte, dass sowohl der humane, als auch der murine HtrA1-Promotor eine *CpG island* aufweisen. Die humane *CpG island* erstreckt sich von -700 bp bis 502 bp, die murine von -260 bp bis 604 bp (4.1). Das Vorhandensein dieser *CpG island* ließ vermuten, dass epigenetische Mechanismen direkt oder indirekt für die transkriptionelle Regulation des HtrA1-Gens von Bedeutung sind. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden weiterführende Experimente, die Hinweise auf eine solche Regulation geben können, durchgeführt.

5.1.1 Epigenetische Pharmazeutika steigern die HtrA1-Expression in Kolonkarzinomzelllinien

Um der Fragestellung nachzugehen, ob epigenetische Mechanismen für die Regulation der HtrA1-Expression eine Rolle spielen, wurden zunächst verschiedene Kolonkarzinomzelllinien, die sich anhand ihres HtrA1-Expressionslevels unterscheiden, mit 5-Aza-dC, einem DNA-Methyltransferaseinhibitor behandelt. 5-Aza-dC wird als Nucleosidanalogon in die DNA inkorporiert und bildet einen kovalenten Komplex mit DNMT1, was den Verlust der DNA-Methyltransferaseaktivität zur Folge hat (Christman 2002). Die 5-Aza-dC-Behandlung der Zellen führte in SW480- und SW620-Zellen zu keinen

signifikanten Änderungen der HtrA1-Expression. In HCT116 war die HtrA1-Expression nach der Behandlung jedoch stark erhöht, wobei die Expressionssteigerung abhängig von der 5-Aza-dC Dosis war. Generell führt die Behandlung mit 5-Aza-dC nur dann zu einer Aktivierung der Genexpression, wenn das jeweilige Gen durch Hypermethylierung inaktiviert ist. Die Tatsache, dass die 5-Aza-dC-Behandlung in HCT116-Zellen eine Steigerung der HtrA1-Expression zur Folge hat, in den SW480- und SW620-Zellen jedoch nicht, könnte demzufolge auf der Inaktivität des Promotors beruhen, die in SW480- und SW620-Zellen nicht besteht.

Um Hinweise auf die Aktivität des HtrA1-Promotors in den verschiedenen Zelllinien zu erhalten, wurden die mRNA-Expressionslevel von HtrA1 bestimmt und verglichen. Dabei zeigte sich, dass die mRNA-Expression von HtrA1 in HCT116-Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien erheblich vermindert war (4.2). Dieses Ergebnis bestätigt, dass der HtrA1-Promotor in den HCT116-Zellen inaktiviert ist und demzufolge durch 5-Aza-dC-Behandlung reaktiviert werden kann.

Um die Rolle epigenetischer Mechanismen für die Expressionsregulation von HtrA1 weiter zu analysieren, wurden die Kolorektalkarzinomzelllinien neben 5-Aza-dC auch mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A behandelt. Diese Behandlung führt durch Hemmung der Histondeacetylasen (HDACs) zu einer globalen Histonacetylierung innerhalb der Zelle. Wenn die Histonacetylierung eine Rolle in der HtrA1-Expression spielen würde, wäre eine Steigerung der HtrA1-Expression zu erwarten. In HCT116-Zellen und SW620-Zellen führte die TSA-Behandlung jedoch zu einer Reduktion der HtrA1-Expression um Faktor 2,4 bzw. 2,6. In SW480-Zellen wurde die HtrA1-Expression um Faktor 1,8 herunter reguliert. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf einen weiteren Effekt von TSA zurückzuführen, welches nicht nur die Histondeacetylaseinhibition vermittelt. Yoshida und Beppu haben 1988 gezeigt, dass Mausfibroblasten nach TSA-Behandlung in der G1- und der G₂M-Phase des Zellzyklus arretiert werden. (Yoshida, Beppu 1988) Ein Arrest in der G1-Phase konnte auch für Kolonkarzinomzelllinien beobachtet werden (Flatmark *et al.* 2006). Untersuchungen der zellzyklusabhängigen Expression von HtrA1 haben außerdem ergeben, dass die Genexpression von HtrA1 in der G1-Phase vermindert ist (Nina Schmidt, unpublizierte Daten). Demnach ist die Reduktion der HtrA1-Expression in den TSA-behandelten Zelllinien möglicherweise auf einen TSA-vermittelten Zellzyklusarrest zurückzuführen.

Die Kombinationsbehandlung der Zelllinien mit 5-Aza-dC und TSA bewirkte bei SW480- und SW620-Zellen, wie die Einzelbehandlung mit 5-Aza-dC, eine Reduktion der HtrA1-Expression. In HCT116-Zellen hingegen verstärkte es die Expressionssteigerung (4.3). In SW620 und SW480 kommt hier möglicherweise wiederum der Effekt der Zellzyklusarretierung

durch TSA und die Tatsache, dass der Promotor in diesen Zellen aktiv ist, zum Tragen. In den HCT116-Zellen hingegen ist die verstärkte Expressionssteigerung vermutlich auf die Inhibition der HDACs zurückzuführen. Das Zusammenwirken der globalen DNA-Demethylierung durch 5-Aza-dC und der Histonacetylierung durch TSA vermittelt wahrscheinlich eine dramatische Veränderung der Chromatinstruktur, was die Zugänglichkeit der HtrA1-Promotorregion und demnach die Transkription erhöht.

5.1.2 Der HtrA1-Promotor ist in HCT116-Zellen hypermethyliert

Zur weiteren Untersuchung der DNA-Methylierung als möglichen Mechanismus der aberranten Genexpression von HtrA1 in Tumorzellen wurden zwei Bereiche innerhalb der *CpG island* des HtrA1-Promotors hinsichtlich der Methylierung an CpG-Stellen untersucht. Dafür wurde die 1992 von Frommer entwickelte Methode der Bisulfit-Sequenzierungs-PCR verwendet (3.2.1.16) (Frommer *et al.* 1992).

In den analysierten Regionen konnte eine Hypermethylierung des HtrA1-Promotors in HCT116-Zellen detektiert werden. SW620-, SW480- und U-373MG-Zellen hingegen wiesen eine fast vollständige Demethylierung des HtrA1-Promotors auf (4.4). Die Methylierung des HtrA1-Promotors in HCT116-Zellen korreliert außerdem mit einer stark verminderten HtrA1-mRNA-Expression in diesen Zellen (4.2).

Bisher wurde die Herunterregulation von HtrA1 in Ovarialkarzinomen (Shridhar *et al.* 2002), Endometrialkarzinomen (Bowden *et al.* 2006), Melanomen (Baldi *et al.* 2002) und Mesotheliomen (Baldi *et al.* 2008) gezeigt. Die Hypermethylierung des HtrA1-Promotors in Verbindung mit einer stark inhibierten HtrA1-Expression in HCT116-Zellen bringt HtrA1 zum ersten Mal mit der Entwicklung des Kolonkarzinoms in Verbindung. Die verminderte Expression von HtrA1 könnte neben den erwähnten Tumorerkrankungen auch für die Tumorigenese des Kolorektalkarzinoms von Bedeutung sein.

Im Verlauf der Krebsentstehung wird die aberrante Methylierung häufig in *CpG islands* beobachtet, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die Überexpression von HtrA1 mit der Inhibition der Zellproliferation in Verbindung steht (Shridhar *et al.* 2002), (Zupkovitz *et al.* 2006). Dementsprechend wurde HtrA1 als potentieller Tumorsuppressor angesehen. Der Nachweis der Promotorhypermethylierung im Rahmen dieser Arbeit unterstützt die Vermutung, dass HtrA1 während der Tumorigenese als Tumorsuppressor fungiert.

Die verminderte HtrA1-Expression in Tumorgewebe ist für Krebserkrankungen jedoch nicht nur aufgrund ihrer tumorsuppressiven Eigenschaften von Bedeutung. Die Herunterregulation der HtrA1-Expression bei Patienten, die an Ovarialkrebs leiden, vermindert die cytotoxischen

Eigenschaften von Cisplatin und Taxol. Die Re-Expression von HtrA1 führte wiederum zu einer Verstärkung der Cisplatin- und Taxol-induzierten Cytotoxizität (Chien *et al.* 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass epigenetische Pharmazeutika die HtrA1-Expression wiederherstellen können. Die Behandlung mit 5-Aza-dC könnte demnach einen denkbaren Ansatz für die Behandlung von Patienten darstellen, die aufgrund der verminderten HtrA1-Expression eine geringere Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika aufweisen. Die Behandlung mit epigenetischen Pharmazeutika, die die HtrA1-Expression wiederherstellen, könnte möglicherweise zu einer Wiederherstellung der Chemosensitivität führen. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass die Kombinationsbehandlung mit Chemotherapeutika und epigenetischen Pharmazeutika die Chemosensitivität wiederherstellen kann. Cisplatin-resistente Ovarialkarzinomzellen, deren MLH1-Promotor (*MutL homolog 1*) hypermethyliert ist, wurden beispielsweise nach 5-Aza-dC-vermittelter MLH1-Re-Expression wieder sensitiv gegenüber Cisplatin (Phesse *et al.* 2008). HSulf-1 (*Heparan Sulfate Glycosaminoglycan-6-O-endosulfatase*), dessen Expression ebenfalls durch *CpG island*-Hypermethylierung in Ovarialkarzinomzellen reprimiert ist und mit einer Chemoresistenz gegenüber Cisplatin korreliert, kann ebenso durch 5-Aza-dC-Behandlung in Zellkulturzellen re-exprimiert werden. Die Re-Expression geht wiederum einher mit einer gesteigerten Cisplatin-Sensitivität (Staub *et al.* 2007). Die Kombinationsbehandlung mit Chemotherapeutika und epigenetischen Pharmazeutika könnte somit eine potentielle Strategie für die Behandlung von Patienten, die eine auf die verminderte HtrA1-Expression zurückzuführende Chemosensitivität ausgebildet haben, darstellen.

Die Mechanismen, die für die aberrante DNA-Methylierung in den *CpG islands* von Tumorsuppressorgenen verantwortlich sind, konnten noch nicht identifiziert werden. Inzwischen konnten jedoch ätiologische Faktoren ausgemacht werden, die zu der DNA-Hypermethylierung beitragen können. Die chronische Exposition humaner epithelialer Bronchialzellen gegenüber Karzinogenen aus Tabak führt beispielsweise zur Hypermethylierung einiger Tumorsuppressorgene, wie z.B. CDH1 (Cadherin 1) und RASSF2A (*ras association domain family protein 2 isoform A*). Wird DNMT1 vor der Exposition ausgeschaltet, werden einige der Tumorsuppressorgene nicht mehr hypermethyliert. Demnach spielt DNMT1 eine Rolle für den Mechanismus der Hypermethylierung (Damiani *et al.* 2008).

Reaktive Sauerstoffspezies (RSS), die häufig bei chronischen Entzündungen auftreten, können ebenfalls die DNA-Methylierung beeinflussen, da halogenierte Pyrimidine, eine Form der RSS-induzierten DNA-Schäden, Analoga von 5-Methyl-Cytosin darstellen und die DNMT1-vermittelte *CpG*-Methylierung *in vitro* und *in vivo* stimulieren (Valinluck, Sowers 2007, Lao *et al.* 2009). Bei der Untersuchung eines Mausmodells für chronische

entzündliche Darmerkrankungen wurde gezeigt, dass 60% der Gene, die bei Kolonkarzinomen hypermethyliert sind, auch in entzündetem Gewebe, das die Vorstufe für die Entstehung von Krebs darstellen kann, aberrant methyliert sind (Hahn *et al.* 2008). O'Hagen und Kollegen haben die Bedeutung der DNA-Schäden für die DNA-Methylierung anhand eines Zellkulturmodells untersucht. Sie induzierten einen DNA-Doppelstrangbruch innerhalb der *CpG island* eines exogenen E-Cadherin-Promotorkonstruktes. Der DNA-Doppelstrangbruch führte zur Rekrutierung von Histondeacetylasen und transkriptioneller Repression (O'Hagan, Mohammad & Baylin 2008). Außerdem wurde die DNA hypermethyliert. Diese Untersuchungen zeigen, dass die *de novo* DNA-Methylierung während der Kanzerogenese durch DNA-Schäden, die aus assoziierten Entzündungsprozessen resultieren, entstehen könnten.

Neben der Bedeutung von DNA-Schäden für die aberrante DNA-Methylierung wurden in der Vergangenheit auch die microRNAs (miRNA) mit der DNA-Methylierung in Verbindung gebracht. Diese einzelsträngigen DNA-Moleküle mit einer Länge von etwa 21 nt regulieren die Genexpression durch partielle komplementäre Hybridisierung mit der 3'-UTR von mRNAs, was die translationale Repression oder Zerstörung der mRNA zur Folge hat. Mindestens zwei miRNA-Familien beeinflussen die Expression von DNMTs. Die miR-29-Familie beispielsweise vermittelt die direkte Repression von DNMT3A und DNMT3B-Transkripten. In Lungenkrebszellen ist der miR-29-Locus jedoch hypermethyliert und transkriptionell reprimiert, was zu einer erhöhten Expression von DNMT3A und DNMT3B führt. Die Wiederherstellung der miR-29-Familie in den Lungenkrebszellen induzierte die DNA-Demethylierung und reduzierte die Zellproliferation und Tumorigenität. (Fabbri *et al.* 2007). Diese Ergebnisse machen das komplexe interdependente Zusammenwirken von miRNAs und DNA-Methylierung deutlich.

Bisher gibt es noch keine Hinweise darauf, inwieweit die Exposition gegenüber Karzinogenen, RSS, DNA-Schäden oder miRNAs bei der Hypermethylierung des HtrA1-Promotors eine Rolle spielen. In Zukunft müssen weiterführende Experimente zeigen inwieweit die genannten Mechanismen für die aberrante Methylierung des HtrA1-Promotors im Verlauf der Krebsentstehung von Bedeutung sind.

5.1.3 Der HtrA1-Promotor ist in Polypen aus APC^{Min/+}-Mäusen hypermethyliert

In HCT116-Zellen, einer Kolorektalkarzinomzelllinie, ist der HtrA1-Promotor hypermethyliert und die HtrA1-Expression inhibiert. HtrA1 könnte demnach potentiell für die Entstehung von Kolonkarzinomen von Bedeutung sein. Um diese Annahme zu untersuchen, wurde

genomische DNA, die aus den Polypen von APC^{Min/+}-Mäusen isoliert wurde, hinsichtlich der Methylierung des HtrA1-Promotors untersucht. Die APC^{Min/+}-Mäuse sind heterozygot für eine Mutation innerhalb des APC-Gens. Diese Mutation führt zu einem verkürzten Genprodukt. Eine ähnliche Mutation ist bei Patienten, die an Familiärer Adenomatöser Polyposis (FAP) leiden und bereits in jungen Jahren zahlreiche Darmpolypen entwickeln, aus denen sich im Laufe der Zeit Tumore entwickeln können, zu finden. In den APC^{Min/+}-Mäusen wird der Krankheitsverlauf nachgeahmt, d.h. die Mäuse entwickeln ebenfalls sehr früh zahlreiche Darmpolypen.

Die HtrA1-Methylierung wurde in insgesamt 13 Polypen im Bereich zwischen -252 bp und -12 bp innerhalb der *CpG island* des Promotors untersucht. Dabei konnte in vier Polypen eine Methylierung des HtrA1-Promotors nachgewiesen werden (4.5 und 4.6).

Die Entwicklung des Kolorektalkarzinoms erfolgt über verschiedene Stufen. Die analysierten Polypen entsprechen dem Adenom-Stadium, also der Vorstufe zum Carcinom. Die Tatsache, dass HtrA1 in einigen Polypen bereits in diesem Stadium methyliert ist, deutet wiederum auf eine Bedeutung von HtrA1 für die Entwicklung des Kolorektalkarzinoms hin.

Für vier der analysierten Polypen, Nummer 13, 18, 22 und 101, war außerdem RNA verfügbar, die hinsichtlich der HtrA1-mRNA-Expression untersucht werden konnte. In allen vier Polypen war die RNA-Expression im Vergleich zu der HtrA1-Expression in MEF-Zellen reduziert. Besonders deutlich war die Reduktion bei Polyp 101 und Polyp 18, die eine Hypermethylierung des HtrA1-Promotors aufweisen (4.6). Diese Ergebnisse bestätigen die Korrelation zwischen der HtrA1-Expression und der HtrA1-Promotorhypermethylierung, die bereits in den Kolonkarzinomzelllinien beobachtet werden konnte.

Trotz der Methylierung des HtrA1-Promotors in den Polypen 101 und 18, unterscheiden sich die Polypen in ihrem HtrA1-Expressionslevel jedoch untereinander, genau wie die HtrA1-Expressionslevel in den Polypen 13 und 22, die einen unmethylierten HtrA1-Promotor aufweisen. Ebenso unterscheiden sich die Zelllinien SW480, SW620 und U-373MG in ihrem HtrA1-Expressionslevel. Sie weisen jedoch alle einen unmethylierten HtrA1-Promotor auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben der DNA-Methylierung noch andere Mechanismen für die Genexpressionsregulation von HtrA1 von Bedeutung sein müssen. Neben der DNA-Methylierung sind wahrscheinlich Transkriptionsfaktoren in die Genexpressionsregulation involviert. 2006 wurde gezeigt, dass AP2 α (*adaptor-related protein complex 2 alpha*) und SRF (*serum response factor*) an den HtrA1-Promotor binden können (Dewan *et al.* 2006). *In silico*-Analysen der HtrA1-Promotorregion haben außerdem das Vorhandensein von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie vorhergesagt (Dewan *et al.* 2006). Die Mitglieder der Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren binden GC-reiche DNA Sequenzen. Untersuchungen von Sp1 haben außerdem gezeigt, dass die Bindung von Sp1 an die DNA-

Bindestelle und die Transkriptionsaktivierung unabhängig vom Vorhandensein der Methylierung innerhalb der Konsensussequenz ist (Holler *et al.* 1988). In Zukunft müssen weiterführende Experimente zeigen, welche Transkriptionsfaktoren in die Regulation der HtrA1-Genexpression involviert sind, wie diese Mechanismen reguliert sind und wie sie mit den epigenetischen Mechanismen zusammenwirken.

5.1.4 MBD2 reguliert die Genexpression von HtrA1

Die bisher präsentierten Ergebnisse konnten zeigen, dass die HtrA1-Genexpression durch die Methylierung der Promotorregion reguliert werden kann. Wie die Interpretation des DNA-Methylierungssignals in die Genexpressionsregulation erfolgt, sollte mit weiteren Experimenten untersucht werden. Im Allgemeinen stellt die Familie der MBD-Proteine eine direkte Verbindung zwischen der DNA-Methylierung und der Etablierung der repressiven Chromatinstruktur dar (Bird, Wolffe 1999). Drei Mitglieder der Proteinfamilie, MBD1, MBD2 und MeCP2 vermitteln über eine Transkriptionsrepressordomäne die Repression der Transkription (Wade 2001). Bisher ist unbekannt, ob die MBD-Proteine eine Rolle für die Regulation der HtrA1-Expression spielen. Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von MBD2 lieferte die cDNA *Microarray*-Analyse von MBD2^{-/-}-Mäusen, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Alan Clarke durchgeführt wurde. Innerhalb dieser Untersuchungen wurde HtrA1 als differentiell exprimiertes Gen identifiziert. Die HtrA1-Genexpression war in den MBD2^{-/-}-Mäusen hoch reguliert. Dieses Ergebnis impliziert, dass HtrA1 ein potentiell Zielgen von MBD2 ist. Um die Rolle von MBD2 für die Regulation der HtrA1-Genexpression weiter zu analysieren, wurden HCT116-Zellen, in denen die HtrA1-Promotorregion hypermethyliert ist, und SW620-Zellen, die einen unmethylierten HtrA1-Promotor aufweisen, viral mit shMBD2-Konstrukten transduziert. Diese Transduktion führte sowohl in den HCT116-Zellen, als auch in den SW620-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der MBD2-Expression. Die Expression von MBD1 und MeCP1, die ebenfalls in der Lage sind an methylierte DNA zu binden, wurde hingegen nicht beeinflusst.

In HCT116-Zellen ging die spezifische MBD2-Repression mit der Stimulation der HtrA1-Expression einher, in SW620-Zellen war die Genexpression von HtrA1 nach Suppression von MBD2 hingegen unverändert (4.7). Die Transduktion der unspezifischen *nonsense* RNA shRNA hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die HtrA1-Expression. Diese Ergebnisse implizieren, dass MBD2 ein negativer Regulator der methylierungsabhängigen HtrA1-Genexpression ist. Die MBD2-vermittelte methylierungsabhängige Rekrutierung der Transkriptionsrepressionsmaschinerie spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle für die

Regulation der HtrA1-Expression. In Zellen, die keine Methylierung des HtrA1-Promotors aufweisen, hat die Suppression von MBD2 hingegen keinen Effekt auf die HtrA1-Expression. Die Tatsache, dass die Expression von MBD1 und MeCP2 als Antwort auf den Verlust von MBD2 nicht gesteigert wird und dass die Suppression von MBD2 ohne Beeinflussung der MBD1- und MeCP2-Expression ausreicht, um die HtrA1-Expression zu steigern, lassen weiterhin vermuten, dass MBD1 und MeCP2 nicht in der Lage sind, anstelle von MBD2 die Repression der HtrA1-Genexpression zu vermitteln. Eine spezifische Assoziation von MBD2 an die Promotorregion bestimmter Gene konnte in der Vergangenheit z.B. für p14/p16 (Magdinier, Wolffe 2001), 14-3-3 σ (Pulukuri, Rao 2006) und hTERT (Chatagnon *et al.* 2009) gezeigt werden. Bisher konnte allerdings noch nicht geklärt werden, wie die Rekrutierung der MBD-Proteine an spezifische Promotoren reguliert ist. Die Bereiche der MBD-Proteine, die sich außerhalb der Methyl-CpG-bindenden Domäne befinden, spielen möglicherweise eine wichtige Rolle für die spezifische MBD-Rekrutierung an die Promotorregionen. Wahrscheinlich sind außerdem Faktoren, die neben den MBDs Bestandteil der Proteinkomplexe sind und die Repression der Transkription vermitteln, für die Spezifität der Bindung an bestimmte Gene verantwortlich. Dafür spricht, dass der MeCP1-Komplex, der neben anderen Faktoren auch MBD2 enthält, mindestens 12 konsekutive Methyl-CpGs für die Bindung erfordert (Lewis *et al.* 1992). Freies MBD2 benötigt hingegen nur ein Methyl-CpG (Bird, Wolffe 1999). Weiterhin können die spezifischen Bindungseigenschaften der MBD-Proteine die Bindung an bestimmte Gene beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Bindung der MBD-Proteine an bestimmte DNA-Sequenzen die Abstände der Methyl-CpGs und der lokale Sequenzkontext eine Rolle spielen (Fraga *et al.* 2003).

5.2 MBD2 als potentieller Angriffspunkt für die Etablierung neuer Therapiestrategien für Krebserkrankungen

Die Methylierung von DNA stellt einen reversiblen Prozess dar. Diese Tatsache hat dazu geführt, Inhibitoren der DNA-Methylierung, welche die Reaktivierung von reprimierten Genen vermitteln, als potentielle Therapeutika für die Behandlung von Krankheiten, bei denen eine aberrante DNA-Methylierung eine Rolle spielt, wie z.B. Krebs, anzusehen. Untersuchungen von APC^{Min/+}-Mäusen haben gezeigt, dass die Adenomentwicklung stark supprimiert ist, wenn die Expression von DNMT1 durch genetische Modulation vermindert wird (Eads, Nickel & Laird 2002). Die konditionale Inaktivierung von DNMT3B in APC^{Min/+}-Mäusen inhibiert

außerdem die Bildung makroskopischer Adenome (Lin *et al.* 2006). Obwohl experimentell die Bedeutung der DNMTs für die Tumorigenese gezeigt werden konnte und DNA-Methylierungsinhibitoren, wie z.B. 5-Aza-dC, verfügbar waren, hat es sehr lange gedauert bis diese Pharmazeutika in der Klinik zum Einsatz kamen. Gründe dafür waren u.a. Probleme bei der Spezifität der Substanzen und toxische Effekte bei Verabreichung hoher Dosen. Inzwischen wurde gezeigt, dass geringere Dosen von 5-Aza-dC die DNA-Hypomethylierung im Tumor effizienter induzieren und zu besseren präklinischen Effekten führen (Kantarjian, Issa 2005). Trotz der Schwierigkeiten mehren sich die Berichte über Verbesserungen, was die mittlere Lebenserwartung und die Tumorprogression nach Behandlung mit 5-Aza-dC betrifft (Kantarjian *et al.* 2006). Dennoch bleiben Bedenken, was die Behandlung mit DNMT1-Inhibitoren betrifft, da diese möglicherweise auch toxische Effekte auf normale Zellen hat, wie verschiedene Experimente vermuten lassen. Die Inaktivierung von DNMT1 im Mausmodell ist beispielsweise letal (Li, Bestor & Jaenisch 1992). Außerdem geht der Verlust von DNMT1 in Fibroblasten mit der p53-abhängigen Induktion der Apoptose einher (Jackson-Grusby *et al.* 2001). Möglicherweise hat die Behandlung mit DNMT1-Inhibitoren in einigen Geweben auch protumorigene Effekte, da z.B. in DNMT1-defizienten Stammzellen die Mikrosatelliteninstabilität erhöht ist (Kim *et al.* 2004). Weiterhin entwickeln Mäuse mit einem hypomorphen DNMT1, die nur 10% des normalen DNMT1 exprimieren, nach 4-8 Monaten aggressive T-Zell-Lymphome (Gaudet *et al.* 2003). APC^{Min/+}-Mäuse mit einem hypomorphen DNMT1 bilden, trotz der Reduktion makroskopischer intestinaler Adenome, vermehrt Mikroadenome und Lebertumore aus (Yamada *et al.* 2005). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Möglichkeit diskutiert, besser die Proteine als therapeutische Ziele in Betracht zu ziehen, welche die DNA-Methylierungsmuster interpretieren, statt das DNA-Methylierungsmuster selbst zu modifizieren. Da in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass MBD2 in der Lage ist an die methylierten Promotoren einiger Tumorsuppressorgenen zu binden, stellt es einen derartigen interessanten Angriffspunkt für die Etablierung neuer Therapie- oder Präventionsstrategien zur Behandlung von Krebserkrankungen dar. Im Gegensatz zu der Inaktivierung von DNMT1 im Mausmodell, ist der *Knock-Out* von MBD2 nicht letal. Die Mäuse weisen normale *Imprinting*- und Methylierungsmuster auf (Hendrich *et al.* 2001). Die Kreuzung des MBD2-*Knock-Outs* in den APC^{Min/+}-Hintergrund führt außerdem nicht, wie bei den APC^{Min/+}-Mäusen mit einem hypomorphen DNMT1, zu einer Steigerung der Lymphomagenese (Sansom *et al.* 2005). Diese Daten indizieren, dass Therapiestrategien, die auf die Inhibition von MBD2 abzielen, nicht zu denselben Bedenken, wie die Inhibition von DNMT1 führen. Vielversprechend war außerdem die Beobachtung, dass sequenzspezifische *Antisense*-Inhibitoren von MBD2 das Wachstum von Lungenkarzinom-

und Kolorektalkarzinomzelllinien *in vitro* und in einem *Xenograft*-Mausmodell inhibieren konnten (Campbell, Bovenzi & Szyf 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass MBD2 in die Genexpressionsregulation von HtrA1, das tumorsuppressive Eigenschaften besitzt und in einer Kolonkarzinomzelllinie und einigen Polypen von APC^{Min/+}-Mäusen hypermethyliert wird, involviert ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Ansicht, dass MBD2 einen interessanten potentiellen Angriffspunkt für neue Therapien zur Behandlung von Krebserkrankungen darstellt.

5.2.1 Die Interaktion zwischen MBD2 und methylierter DNA kann durch DNA-interkalierende Substanzen inhibiert werden

Die Inhibition der Interaktion zwischen MBD2 und methylierter DNA ist ein potentieller Therapieansatz für die Behandlung von Krebserkrankungen. Um spezifische Inhibitoren zu identifizieren, wurde von Prof. Dr. Alan Clarke ein HTS (*High Throughput Screen*) durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Substanzen identifiziert, die in der Lage waren die MBD2-DNA-Interaktion zu inhibieren. All diese Substanzen wiesen eine ähnliche Grundstruktur auf, waren jedoch aufgrund ihrer Toxizität als potentielle Therapeutika nicht geeignet. Um andere Inhibitoren der DNA-MBD2-Interaktion zu identifizieren, wurden weitere Substanzen, die eine ähnliche Grundstruktur wie die im Rahmen des HTS identifizierten Substanzen, aufwiesen, auf ihre Fähigkeit zur MBD2-Inhibition hin untersucht. Dazu wurde zunächst ein EMSA etabliert, der die Analyse der MBD2-Bindung an DNA ermöglicht.

5.2.1.1 MBD2 bindet *in vitro* an methylierte DNA

Mit Hilfe des EMSAs wurde gezeigt, dass rekombinant hergestelltes MBD2b in der Lage ist an kurze DNA-Oligonucleotide zu binden, wenn diese im Zentrum ein methyliertes Cytosin aufweisen und das stöchiometrische Verhältnis von MBD2 und DNA bei 1:1 liegt (4.10). Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene DNA-Oligonucleotide verwendet. Eins der Oligonucleotide entsprach dem DNA-Oligonucleotid, welches von Ohki 2001 für die NMR-Strukturanalyse der MBD von MBD1 in Komplex mit methylierter DNA verwendet wurde. Da die MBD innerhalb der MBD-Proteinfamilie hochkonserviert ist (Abb. 5.1) wurde dieses DNA-Oligonucleotid als Positivkontrolle für den EMSA verwendet.

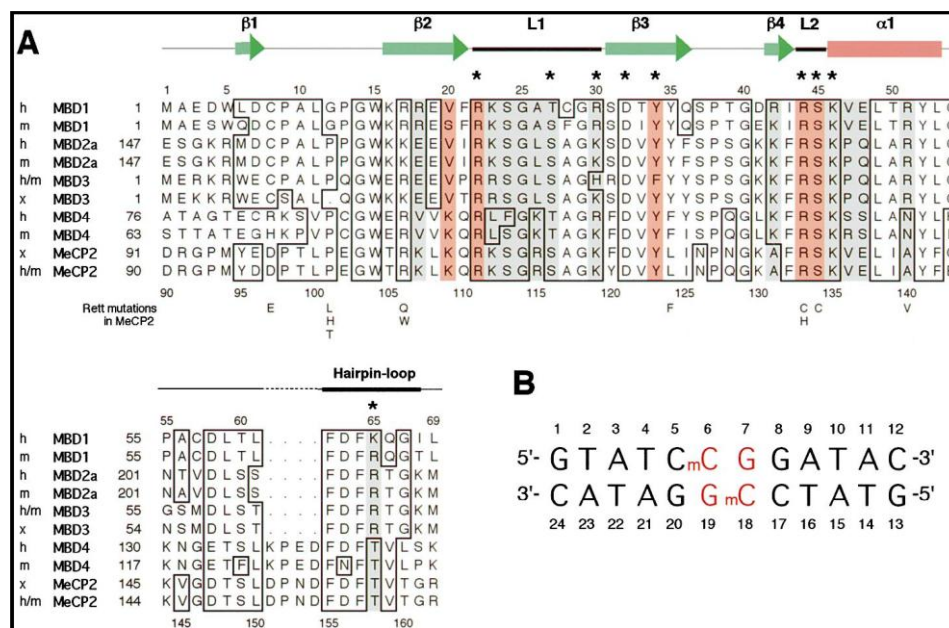


Abb. 5.1: Protein- und Oligonucleotidsequenzen

(A) Sequenz-Alignment der MBDs der MBD-Familienmitglieder aus Mensch (m), Maus (m), und *Xenopus laevis* (x). Die Nummerierung ist dargestellt für das humane MBD1 (oben) und das humane MeCP2 (unten). Konservierte Aminosäurereste sind eingekreist, wobei rot-markierte Reste mit DNA-Basen und grau-markierte mit dem DNA-Rückgrat interagieren. Sekundärstrukturelemente des humanen MBD1 innerhalb des MBD1-DNA-Komplexes sind oberhalb der Sequenz angegeben. Reste, die für die DNA-Bindung von Bedeutung sind, sind markiert (*). (B) Oligonucleotidsequenz, die von Ohki für die NMR-Strukturanalyse von MBD1 in Komplex mit methylierter DNA und in dieser Arbeit für die Etablierung des EMSAs verwendet wurde (Ohki *et al.* 2001).

Wie die MBD von MBD1 (Ohki *et al.* 2001) bindet MBD2b methylierungsabhängig an dieses DNA-Oligonucleotid. Demnach ist das rekombinant hergestellte MBD2b unter den gewählten experimentellen Bedingungen in der Lage, zwischen methylierter und unmethylierter DNA zu unterscheiden (4.10). Die Tatsache, dass MBD2b wie MBD1 an das gewählte DNA-Oligonucleotid binden kann, unterstützt außerdem die Vermutung, dass die Erkennung der Methyl-CpGs über einen ähnlichen Mechanismus erfolgt. Anhand der NMR-Struktur postulierte Ohki, dass die MBD_{MBD1} über einen hydrophoben Bereich direkt mit den Methylgruppen an der DNA interagiert (Ohki *et al.* 2001). 2008 lieferte die Röntgenstrukturanalyse ein anderes Modell für die Bindung der MBD von MeCP2 an methylierte DNA. Anhand der Struktur wurde postuliert, dass die MBD Wassermoleküle in der großen Furche der methylierten DNA erkennt, statt der Cytosinmethylierung *per se* (Ho *et al.* 2008). Die Beteiligung von Wassermolekülen wurde bei der NMR-Analyse der MBD_{MBD1} nicht in Betracht gezogen. Wenn die Aminosäurereste innerhalb der MBD_{MeCP2}, die mit den Wassermolekülen interagieren, durch Mutagenese so ausgetauscht werden, dass keine Interaktion mehr stattfinden kann, ist die CpG-Bindung reduziert. In den MBDs von MBD1 und MBD3 führen die Mutationen der äquivalenten Aminosäuren zu ähnlichen Effekten.

Demnach stellt die Assoziation der MBD an Wassermoleküle während der Methyl-CpG-Bindung vermutlich einen generellen Mechanismus dar (Ho *et al.* 2008).

Für den EMSA wurde außerdem ein DNA-Oligonucleotid verwendet, das einem Teil des HtrA1-Promotors entspricht. Dieses DNA-Oligonucleotid wurde ebenfalls in unmethylierter Form oder mit einem zentralen methylierten Cytosin im EMSA eingesetzt. MBD2b war in der Lage methylierungsabhängig auch an dieses HtrA1-Oligonucleotid zu binden (4.10). Dieses Ergebnis zeigt, dass freies MBD2b für die Bindung an DNA lediglich ein methyliertes Cytosin benötigt, wobei die flankierenden Sequenzen für die *in vitro*-Bindung keine große Bedeutung zu haben scheinen. *In vivo* wurde jedoch von einer Präferenz bestimmter MBDs für einzelne Promotoren berichtet (Magdinier, Wolffe 2001).

Mit Hilfe des etablierten EMSAs ist es möglich die Interaktion zwischen MBD2b und methylierter DNA zu untersuchen. Demnach eignet er sich für die Untersuchung potentieller Inhibitoren der DNA-Bindung von MBD2b.

5.2.1.2 Die Interaktion von MBD2b mit methylierter DNA kann durch Substanzen, die an DNA binden, inhibiert werden

Mit Hilfe des EMSAs wurden 25 Substanzen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Bindung von MBD2 an methylierte DNA zu inhibieren, untersucht. Dabei konnten drei Substanzen identifiziert werden, die in der Lage waren die Interaktion zwischen MBD2b und DNA zu inhibieren. (4.11). Substanz YKS01178 war der stärkste Inhibitor der MBD2b-Bindung und wurde für weiterführende Experimente, die Aufschluss über die Bindungsfähigkeit an DNA bzw. MBD2b geben sollten, ausgewählt. Mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC) wurde untersucht, ob Substanz YKS01178 an MBD2b oder an das HtrA1-Oligonucleotid bindet. Die Untersuchungen ergaben, dass der Inhibitor nicht in der Lage ist an MBD2b zu binden. Stattdessen bindet YKS01178 in einer endothermen Reaktion an das DNA-Oligonucleotid, das einem Teil des HtrA1-Promotors entspricht (4.12).

YKS01178 verfügt, wie die anderen getesteten Substanzen, über ein bipykliches Ringsystem, das relativ planar ist. Aufgrund dieser Struktur könnte YKS01178 in der Lage sein, in die DNA zu interkalieren. Möglicherweise interkaliert YKS01178 so in die DNA, dass MBD2b nicht mehr in der Lage ist an die Methyl-CpGs zu binden. Mit Hilfe der Experimente konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen DNA und MBD2b durch Substanzen, die an die DNA binden, gehemmt werden kann.

DNA-Interkalantien, wie z.B. Doxorubicin, werden in der Klinik als Chemotherapeutika bei der Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt. Ihr Wirkmechanismus beruht darauf, dass nach kovalenter Bindung der Substanz an die DNA die Polymerasen nicht mehr binden können. Somit sind Replikation und Transkription inhibiert. Interkalierende

Chemotherapeutika werden oft für die Behandlung solider Tumoren eingesetzt. Substanzen mit diesem Wirkmechanismus führen jedoch zu starken Nebenwirkungen, da sie die Proliferation aller Zellen, insbesondere derer die sich oft teilen, blockieren. Die Toxizität ist jedoch dosisabhängig. Dabei wird anhand der Schwere der Tumorerkrankung entschieden, welche Dosis bzw. welche Nebenwirkungen bei der Behandlung in Kauf genommen werden. Bei der Suche nach Substanzen, die für eine potentielle Therapie, die auf MBD2 abzielt, in Frage kommen, wäre es aufgrund der starken Nebenwirkungen von DNA-Interkalantien erstrebenswert Inhibitoren zu finden, die nicht an die DNA, sondern an MBD2 binden und dessen Interaktion mit Methyl-CpGs inhibieren. Von Interesse wären dementsprechend insbesondere Substanzen, welche die Interaktion zwischen MBD und Methyl-CpG stören. Bisher ist nicht genau bekannt, inwieweit die Bereiche außerhalb der MBD für die Funktion von MBD2 von Bedeutung sind. Möglicherweise eignen sich auch diese Bereiche für die Modellierung von inhibitorisch wirksamen Substanzen, die beispielsweise die Interaktion mit dem Transkriptionsrepressorkomplex verhindern.

5.2.1.3 Die DNA-Bindung beeinflusst die Oligomerisierung von MBD2

MBD2 ist Bestandteil des MeCP1-Transkriptionsrepressorkomplexes (Ng *et al.* 1999). Dabei stellt MBD2 die DNA-bindende Komponente des Komplexes dar. Bisher ist noch unbekannt, in welchem oligomeren Zustand MBD2 an die DNA bindet. Aus diesem Grund wurde der oligomere Zustand von MBD2 bei Bindung an das HtrA1-Oligonucleotid mit einem zentralen methylierten Cytosin mit Hilfe der Gelfiltration analysiert. Die Untersuchung hat ergeben, dass das rekombinante MBD2b in Abwesenheit von DNA als Trimer vorliegt. Nach Zugabe des HtrA1-Oligonucleotids liegt MBD2b eher als Tetramer vor, wobei angenommen wurde, dass ein MBD2b-Molekül an ein DNA-Molekül bindet (4.13.1). Diese Annahme ergab sich aus Strukturanalysen, die für die MBDs von MBD1 und MeCP2 durchgeführt wurden (Ohki *et al.* 2001)(Ho *et al.* 2008). Die funktionelle Bedeutung dieses Oligomers muss in Zukunft analysiert werden. Eventuell beeinflusst die Oligomerisierung die Affinität von MBD2b an die DNA oder die Bindung anderer Proteine, die für die Regulation der Transkription von Bedeutung sind.

Außerdem wurde der oligomere Zustand der MBD von MBD2 (MBD_{MBD2}) in Abhängigkeit von der Bindung an das methylierte HtrA1-Oligonucleotid untersucht. Die Analyse ergab, dass die MBD_{MBD2} in Abwesenheit des DNA-Oligonucleotids als Monomer vorlag. Nach Zugabe der DNA änderte sich der oligomere Zustand nicht. Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen aus den Strukturanalysen von Ohki und Ho, die gezeigt haben, dass die monomere MBD_{MBD1} an ein methyliertes Cytosin bindet. Die Tatsache, dass die MBD_{MBD2} nach Zugabe der methylierten DNA keine Veränderung des oligomeren Zustands im

Gegensatz zu MBD2b zeigt, weist darauf hin, dass die Oligomerisierung von MBD2b durch Bereiche vermittelt wird, welche außerhalb der MBD liegen. Unter Umständen könnte das putative *coiled coil*-Motiv, das sich im Bereich zwischen den Aminosäuren 217 - 239 von MBD2 befindet, für die Oligomerisierung von Bedeutung sein.

In Zukunft muss geklärt werden, ob Oligomere von MBD2b beispielsweise auch innerhalb des Proteinkomplexes MeCP1 vorkommen. Möglicherweise ist das Vorhandensein der oligomeren Form von MBD2 für die stabile Bildung dieses Komplexes notwendig. Außerdem wurde gezeigt, dass MeCP1 im Gegensatz zu MeCP2, bevorzugt an DNA-Regionen, die eine sehr hohe Dichte an methylierten CpGs aufweisen, bindet (Meehan *et al.* 1989). Eventuell spielt das Vorhandensein von Oligomeren eine Rolle für die erhöhte Affinität des MeCP1-Komplexes gegenüber DNA-Regionen, die eine sehr dichte Methylierung aufweisen. Da es sich bei der analysierten Form von MBD2 um eine N-terminal trunkierte Variante handelt, bleibt zu untersuchen, ob die Oligomerisierung auch für die vollständige Form von MBD2 eine Rolle spielt. Die Beobachtung, dass MBD2b als Oligomer vorliegt, könnte einen wichtigen Mechanismus, der für die Funktion von MBD2 von Bedeutung ist, darstellen. Die Beeinflussung der Oligomerisierung könnte potentiell ein weiterer Angriffspunkt für die Inhibition von MBD2 sein.

5.2.2 MBD2b ist ein Substrat von HtrA1

Um zu untersuchen, ob MBD2b ein Substrat von HtrA1 ist, wurde *in vitro* die proteolytische Aktivität des HtrA1 gegenüber MBD2b analysiert. Die Produkte der Reaktion wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Die Analyse der Proteolyseprodukte hat gezeigt, dass HtrA1 in der Lage ist, MBD2b bereits nach 1 h und bei geringen Enzymkonzentrationen zu proteolysieren. Die Reaktion wurde nicht nur mit freiem MBD2b, sondern auch mit MBD2b, das an das methylierte HtrA1-Oligonucleotid gebunden ist, durchgeführt. HtrA1 war in der Lage, auch das gebundene MBD2b abzubauen. Der Vergleich des Bandenmusters, das nach Verdau von ungebundenem MBD2b entstanden ist, mit dem, das bei Verdau des DNA-gebundenem MBD2b entstanden ist, hat große Ähnlichkeiten gezeigt. Lediglich eine Bande bei etwa 15 kDa wurde in Anwesenheit der DNA etwas schlechter abgebaut. Die Identität dieser Bande wurde mittels LC-ESI-MS bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Bande dem N-Terminus des rekombinant hergestellten MBD2b Proteins entspricht und hauptsächlich der Methyl-CpG-bindenden Domäne (MBD) von MBD2b entspricht. Die DNA-Bindung ändert demnach die Zugänglichkeit von MBD2b für HtrA1 insbesondere im Bereich der MBD, was zu einer verlangsamten Proteolyse dieses Bereichs führt.

Um Unterschiede innerhalb des Schnittmusters von HtrA1 in der freien und der gebundenen MBD2b-Form zu identifizieren, wurde eine weitere massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Diese hat ergeben, dass HtrA1 bevorzugt nach hydrophoben Aminosäuren schneidet. Eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren wurde auch für DegP ermittelt (Spiess, Beil & Ehrmann 1999, Krojer *et al.* 2008, Kolmar, Waller & Sauer 1996). Bei DegP handelt es sich um eine bakterielle Serinprotease, die wie HtrA1 zur Familie der HtrA-Proteasen gehört. Es ist ein essentieller Faktor für die periplasmatische Proteinqualitätskontrolle.

Die Analyse der Schnittstellen hat außerdem Unterschiede innerhalb des Schnittmusters zwischen freiem und DNA-gebundenem MBD2b gezeigt. Die gebundene Form von MBD2b wurde an 13 Stellen geschnitten, die in der ungebundenen Form nicht gespalten wurden. Drei dieser exklusiven Schnittstellen befinden sich innerhalb der MBD. Die ungebundene Form von MBD2b hat neun zusätzliche Schnittstellen, die sich alle außerhalb der MBD befinden. Diese Unterschiede innerhalb des Schnittmusters implizieren, dass es nach DNA-Bindung zu Konformationsänderungen innerhalb von MBD2b kommt. Demzufolge sind einige Schnittstellen besser, andere schlechter zugänglich für HtrA1. Da die exklusiven Schnittstellen nicht nur innerhalb der MBD auftreten, beschränken sich diese Konformationsänderungen wahrscheinlich nicht nur auf die MBD, die direkt mit der methylierten DNA interagiert, sondern wirken sich auch auf die übrigen Bereiche von MBD2b aus. Bisher sind keine Strukturinformationen dazu verfügbar, welche Konformationsänderung die DNA-Bindung bei MBD2b bewirkt.

Auffällig ist außerdem, dass HtrA1 sehr oft innerhalb des putativen *coiled coil*-Motivs von MBD2b schneidet. Dieses Motiv ist häufig für die Assoziation von Proteinen von Bedeutung. Bisher ist noch nicht bekannt, welche Funktion das *coiled coil*-Motiv für MBD2b hat. Möglicherweise ist es für die Bildung von Oligomeren oder die Assoziation mit anderen Proteinen von Bedeutung.

Mit Hilfe der Experimente konnte gezeigt werden, dass MBD2b *in vitro* ein Substrat von HtrA1 darstellt. Innerhalb der Zelle ist MBD2 im Nucleus lokalisiert. Clawson und Kollegen konnten 2008 HtrA1 ebenfalls im Zellkern nachweisen (Clawson *et al.* 2008). Zukünftige Experimente müssen zeigen, ob MBD2b auch *in vivo* von HtrA1 abgebaut werden kann.

5.3 Einfluss der Re-Expression von HtrA1 auf verschiedene zelluläre Prozesse

Um mehr Informationen über die funktionelle Bedeutung von HtrA1 in Krebszellen zu erhalten, wurde die Genexpression von HtrA1 in HCT116-Zellen, die aufgrund der Hypermethylierung des HtrA1-Promotors kaum HtrA1 exprimieren, durch retroviralen Gentransfer wiederhergestellt (4.15.1). Mit Hilfe dieser Zellen wurde der Einfluss von HtrA1 auf verschiedene zelluläre Prozesse analysiert.

5.3.1 HtrA1 ist sowohl intrazellulär, als auch extrazellulär lokalisiert

Zunächst wurde die Lokalisation des re-exprimierten HtrA1 mit Hilfe der Konfokalen-Laser-Raster-Mikroskopie untersucht. Die mikroskopische Untersuchung ergab, dass die HCT116-Kontrollzellen, die mit dem retroviralen Leervektor transduziert wurden, keine HtrA1-Expression aufweisen (4.15.2). Die Methylierung des HtrA1-Promotors in den HCT116-Zellen korreliert demnach nicht nur, wie bereits gezeigt, mit einer Inhibition der mRNA-Expression, sondern auch der Inhibition der Proteinexpression. Nach Re-Expression ist HtrA1 sowohl intrazellulär, als auch extrazellulär lokalisiert (4.15.2). Dabei ist der Großteil der HtrA1-Expression außerhalb der Zelle zu beobachten. Frühere Studien haben ebenfalls ergeben, dass HtrA1 sowohl außerhalb, als auch innerhalb der Zelle lokalisiert ist. Die Untersuchungen von Grau und Kollegen haben gezeigt, dass 20% von HtrA1 intrazellulär und 80% extrazellulär lokalisiert sind (Grau *et al.* 2005). In Plazentazellen wurde die intra- und extrazelluläre Lokalisation von HtrA1 durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt (De Luca *et al.* 2004). 2008 zeigten Clawson und Kollegen außerdem, dass HtrA1 auch innerhalb des Zellkerns vorkommt und dort mit den HPV-Proteinen E6 und E7 interagieren kann (Clawson *et al.* 2008). HtrA1 verfügt über eine Signalsequenz und wird demnach über den sekretorischen Pfad exportiert. Bisher ist unklar, wie die Lokalisation zustande kommt.

Die Tatsache, dass HtrA1 sowohl intrazellulär als auch extrazellulär ist, impliziert, dass HtrA1 Substrate im Nucleus, im Cytoplasma und im Extrazellularraum hat. Diese Substrate müssen in Zukunft identifiziert werden, um mehr Informationen über die Rolle von HtrA1 innerhalb der Zelle zu erhalten.

5.3.2 HtrA1 inhibiert die Migration

Proteasen spielen häufig eine Rolle für die Regulation der Zellmigration und Zellinvasion. Um zu untersuchen, ob HtrA1 für die Migration eine Rolle spielt, wurden ein Wundheilungs-Assay und ein 3D-Migrations-Assay durchgeführt. Dafür wurden die HCT116-Zellen mit rekonstituierter HtrA1-Expression und die Kontrollzellen verwendet. Die Zellen mit rekonstituierter HtrA1-Expression zeigten in beiden Assays eine verminderte Migration im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden (4.15.3). Im Wundheilungs-Assay war die Wunde, die in der HCT116 p50 HtrA1-Zellschicht erzeugt wurde, nach 24 h deutlich größer als die der HCT116 p50 Leervektorzellen. Die Re-Expression von HtrA1 inhibierte demnach die direktionale Zellmigration im Vergleich zu den Kontrollzellen mit Leervektor.

Die 3D-Migration wurde mit Hilfe eines Assays, der auf dem Prinzip der Boyden-Kammer basiert, untersucht. Bei Vorhandensein eines FCS-Gradienten wurde die Migrationsrate der HCT116 p50 Leervektorzellen gesteigert, auf die Migrationsrate der HCT116 p50 HtrA1 Zellen hatte der FCS-Gradient hingegen keinen signifikanten Einfluss (4.15.3.2). Nach Verlust der HtrA1-Expression bewirkt das Vorhandensein eines FCS-Gradienten eine erhebliche Steigerung der Migrationsrate. Sowohl bei Anwesenheit des FCS-Gradienten, als auch ohne Gradient, war die Migrationsrate der Zellen mit rekonstituierter HtrA1-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindert. HtrA1 inhibiert demnach die chemotaktische und die zufällige Migration. Mit Hilfe dieser Experimente konnte erstmals gezeigt werden, dass die Re-Expression von HtrA1 in Kolonkarzinomzelllinien zu einer Inhibition der Zellmigration führt.

In den letzten Monaten wurde HtrA1 auch von anderen Arbeitsgruppen mit der Regulation der Zellmigration in Verbindung gebracht. Eine Inhibition der chemotaktischen und zufälligen Zellmigration nach Rekonstitution der HtrA1-Expression wurde 2008 beispielsweise von Ajayi und Kollegen in Trophoblastenzellen beobachtet. Neben Wildtyp-HtrA1 wurde in dieser Studie auch eine proteolytisch inaktive Form von HtrA1 in den Trophoblastenzellen exprimiert. Da diese ebenfalls die chemotaktische und zufällige Migration inhibierte, scheint die Regulation der Zellmigration durch HtrA1 nicht abhängig von der Proteaseaktivität zu sein (Ajayi *et al.* 2008). 2009 berichteten Chien und Kollegen, dass HtrA1 ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein ist, wobei die Mikrotubuli-Assoziation abhängig von der PDZ-Domäne ist. Sie konnten außerdem zeigen, dass HtrA1 die Mikrotubuli-Stabilität reguliert. Diese Beobachtungen legen nahe, dass HtrA1 die Zellmigration durch Beeinflussung der Cytoskelett-Reorganisation spielt (Chien *et al.* 2009). In der Vergangenheit wurden bereits

andere Proteasen mit Reorganisation des Cytoskeletts in Verbindung gebracht, wie z.B. die Familie der Calpaine (Carragher, Frame 2002).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass HtrA1 eine wichtige Rolle für die chemotaktische und zufällige Migration spielt. Der genaue Mechanismus, wie HtrA1 durch Mikrotubuli-Assoziation in die Reorganisation des Cytoskeletts eingreift, muss noch identifiziert werden. Die Tatsache, dass HtrA1 in malignen Zellen die Motilität beeinflussen kann, unterstützt außerdem die Bedeutung von HtrA1 als Protease mit tumorsuppressiven Eigenschaften.

5.3.3 Die Rekonstitution von HtrA1 hat keinen Einfluss auf die Apoptose in HCT116-Zellen

In entarteten Zellen ist das Gleichgewicht von Zellteilung und Apoptose häufig beeinträchtigt, was die Tumorigenese fördert. Mit Hilfe der rekonstituierten Zelllinien, soll untersucht werden, ob die HtrA1-Expression in HCT116-Zellen die Apoptoseinduktion beeinflusst. Dazu wurde die Apoptoseinduktion durch Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen, die die Apoptose über unterschiedliche Mechanismen induzieren, provoziert und mit Hilfe eines Apoptose-Assays, der spezifisch die Mononucleosomen und Oligonucleosomen in der cytoplasmatischen Fraktion der Zelllysate bestimmt, ausgewertet. Nocodazol-, Taxol-, und Camptotecin-Behandlung führten dabei zu einer effektiven Induktion der Apoptose, wobei keine Unterschiede zwischen HCT116 p50 Leervektorzellen und HCT116 p50 HtrA1-Zellen zu beobachten war. Weiterhin führte die Cisplatin-Behandlung im Vergleich zu der Lösungsmittelkontrolle zu keiner Induktion der Apoptose. Möglicherweise war die gewählte Cisplatin-Dosis und Inkubationsdauer nicht ausreichend für eine Apoptoseinduktion.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu einer Studie von Chien und Kollegen, die 2002 zeigen konnten, dass die exogene Expression von HtrA1 bei Ovarialkarzinomzellen zur Induktion der Apoptose führt. Dabei war die Induktion abhängig von der Proteaseaktivität, da die Expression einer inaktiven Form von HtrA1 die Apoptose nicht induzierte. Weiterhin war die HtrA1-induzierte Apoptose bei Zugabe eines Caspase-Inhibitors nicht vermindert, was auf einen Caspase-unabhängigen Mechanismus der Apoptoseinduktion hindeutet (Chien *et al.* 2004). Inwieweit HtrA1 die Apoptose über einen Caspase-unabhängigen Mechanismus regulieren kann, müssen weiterführende Experimente zeigen. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Beobachtungen hinsichtlich der Wirkung der HtrA1-Rekonstitution auf die Apoptose in den verschiedenen Zelllinien auf gewebsspezifische Unterschiede in der HtrA1-Expression zurückzuführen. Generell ist die HtrA1-Expression, wie mittels Northern-Blot-Analysen gezeigt wurde, in Ovarien deutlich höher als in Dünndarm und in Kolon (Nie *et al.* 2006, Chien *et al.* 2004). Variationen hinsichtlich der endogenen HtrA1-Expression in den

verschiedenen Geweben könnten eventuell die Ansprechbarkeit auf die ektopische HtrA1-Expression beeinflussen. Es ist demnach notwendig weiterführende Experimente, die die Analyse der Caspase-unabhängigen Apoptose ermöglichen, durchzuführen. Dafür sollten möglichst Modelle ausgewählt werden, die die unterschiedlichen gewebsspezifischen HtrA1-Expressionslevel repräsentieren.

5.3.4 Auswirkungen der HtrA1-Rekonstitution in Nacktmaustumoren

Da *in vitro*-Experimente nicht den natürlichen zellulären Kontext des Tumorgewebes nachbilden können, wurden zusätzlich zu den oben beschriebenen Zellkultur-Experimenten *in vivo*-Tumorigenitätsstudien mit Nacktmäusen durchgeführt. Dafür wurden HCT116-Zellen mit rekonstituierter HtrA1-Expression und Kontrollzellen, die mit dem Leervektor transduziert wurden, subkutan in die Flanken von Nacktmäusen injiziert und das Tumorstadium beobachtet.

Die Analyse der HCT116-Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede des Tumorstadiums (4.16). Lediglich an Tag 23 des Experiments war die Tendenz zu erkennen, dass die Tumore, die aus HtrA1-überexprimierenden Zellen resultierten kleiner waren. Leider konnte der Tumorstadiumsverlauf nicht weiter beobachtet werden, da die Tumormasse für die Mäuse zu hoch war. In diesem Experiment konnte demnach die vermutete tumorsuppressive Wirkung von HtrA1 *in vivo* nicht nachgewiesen werden. Das Experiment ist allerdings nicht planmäßig verlaufen, da das Tumorstadium ursprünglich über einen längeren Zeitraum verfolgt werden sollte. Die injizierten Zellen wuchsen jedoch sehr schnell an und das Tumorstadium konnte anschließend lediglich über einen Zeitraum von 23 Tagen dokumentiert werden. Um wichtige Informationen über das tumorigene Potential von HtrA1 *in vivo* zu bekommen, sollte das Experiment wiederholt werden. Dabei sollte in Betracht gezogen werden, eine geringere Zellzahl zu injizieren, um das Tumorstadium über einen längeren Zeitraum verfolgen zu können. Weiterhin wäre es denkbar, statt der stabil rekonstituierten HCT116-Zellen ein Zellmodell zu verwenden, das eine induzierbare HtrA1-Expression ermöglicht.

Interessant wäre es außerdem, die subkutanen Tumorigenitätsuntersuchungen mit orthotropen Mausexperimenten zu ergänzen. Bei diesen Experimenten werden die Zellen in das Organ injiziert, aus dem sie ursprünglich stammen (Mitchell, Schumacher 1997, Garofalo *et al.* 1993). Sie ermöglichen neben der Analyse des Tumorstadiums auch die Untersuchung des Metastasierungsverhaltens bei tumorigenen Zellen. Mit Hilfe eines solchen Modells könnte der Frage nachgegangen werden, ob die in den Migrationsstudien gefundenen Daten mit dem Metastasierungsverhalten korrelieren.

5.4 Modell für die epigenetische Regulation von HtrA1 in Tumorzellen und die Konsequenzen für die Zelle

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse kann nun folgendes Modell für die Regulation von HtrA1 und die Konsequenzen der aberranten Expressionsverminderung in Tumorzellen aufgestellt werden (Abb. 5.2). Die verminderte HtrA1-Expression in Tumorzellen ist auf die Hypermethylierung der *CpG island* innerhalb der HtrA1-Promotorregion zurückzuführen. MBD2, ein Mitglied der MBD-Proteinfamilie, bindet an den methylierten HtrA1-Promotor und rekrutiert einen Transkriptionsrepressorkomplex. Die Bestandteile dieses Transkriptionsrepressorkomplexes vermitteln die Etablierung von transkriptionell inaktivem Chromatin, u.a. durch Histondeacetylierung. Die Transkriptionsmaschinerie ist nicht mehr in der Lage an den HtrA1-Promotor zu binden und die Genexpression von HtrA1 wird somit abgeschaltet.

Innerhalb der Zelle hat HtrA1 verschiedene Funktionen. Die Überexpression von HtrA1 führt zu einer Inhibition des Zellwachstums und der Zellproliferation *in vitro* und *in vivo* (Baldi *et al.* 2002, Zupkovitz *et al.* 2006, Chien *et al.* 2004). Die Inhibition der HtrA1-Expression, die durch die DNA-Methylierung vermittelt wird, geht demnach einher mit einer fehlregulierten Wachstums- und Proliferationskontrolle.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die Überexpression von HtrA1 in Kolonkarzinomzellen die Migration der Zellen vermindert. In Zellen, die kein HtrA1-exprimieren, ist die Migrationsrate dementsprechend erhöht.

Das Fehlen von HtrA1 beeinflusst demzufolge mehrere Funktionen der Zelle, die für die Entartung von Zellen von Bedeutung sind. Die verminderte HtrA1-Expression führt zu einer fehlenden Kontrolle von Zellwachstum, Zellproliferation und Zellmigration, was die Tumorprogression fördert.

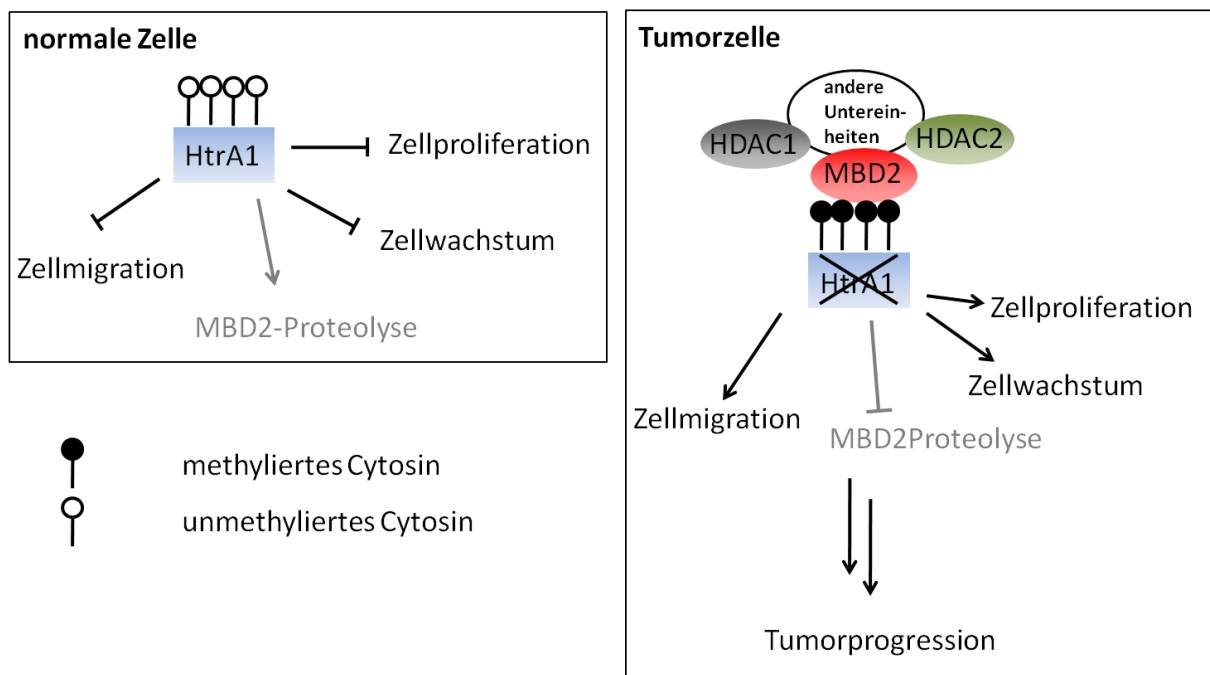


Abb. 5.2: Modell für die epigenetische Regulation von HtrA1 in Tumorzellen

In normalen Zellen ist der Promotor von HtrA1 unmethyliert. HtrA1 wird exprimiert und inhibiert Zellproliferation, Zellwachstum und Zellmigration. In Tumorzellen ist HtrA1 methyliert, so dass MBD2 an den Promotor von HtrA1 binden und dessen Expression inhibieren kann. Zellwachstum, Zellproliferation und Zellmigration werden nicht länger kontrolliert und tragen zur Progression des Tumors bei. MBD2 konnte als *in vitro*-Substrat von HtrA1 identifiziert werden. Es bleibt zu untersuchen, ob MBD2 auch *in vivo* von HtrA1 abgebaut werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem MBD2 *in vitro* als Substrat von HtrA1 identifiziert werden. In Zukunft muss überprüft werden, ob MBD2 *in vivo* ebenfalls ein Substrat von HtrA1 darstellt. Diese potentielle Funktion von HtrA1 könnte ebenfalls für die Tumorprogression von Bedeutung sein.

5.5 Ausblick - Weitere funktionelle Charakterisierung von HtrA1 und Identifikation von MBD2-Inhibitoren

Die präsentierten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass HtrA1 durch die Hypermethylierung der *CpG island* in Tumorzellen herunter reguliert ist. MBD2, ein Mitglied der MBD-Proteinfamilie, bindet an den methylierten Promotor und vermittelt dessen transkriptionelle Repression. Neben der epigenetischen Regulation von HtrA1 müssen jedoch auch Transkriptionsfaktoren für die Regulation der Genexpression verantwortlich sein, da die Genexpression nach Promotorhypermethylierung zwar vermindert ist, aber dennoch gewisse Unterschiede aufweist. Bisher konnten zwei Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, AP2 α und SRF, die an den HtrA1-Promotor binden können (Dewan *et al.* 2006). Um die transkriptionelle Regulation von HtrA1 besser verstehen zu können, sollten die regulatorischen Elemente und putativen Transkriptionsfaktorbindestellen innerhalb der Promotorregion identifiziert und analysiert werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, wie die Expression von HtrA1 in der normalen Zelle reguliert ist und welche Signalkaskaden für die Regulation von Bedeutung sein könnten.

Das Fehlen von HtrA1 hat Folgen für die Kontrolle von Zellwachstum, Zellproliferation und Zellmigration und trägt somit zur Tumorprogression bei. Bisher ist noch ungeklärt, wie genau diese Mechanismen reguliert werden. Um mehr Informationen über die Funktion von HtrA1 in der Zelle zu gewinnen, sollte HtrA1 biochemisch charakterisiert werden, um Hinweise hinsichtlich der Temperatur-, pH-, und Salz-Toleranz zu erhalten. Außerdem müssen die Substrate von HtrA1 identifiziert werden. Für die Funktion von HtrA1 scheint jedoch nicht nur dessen proteolytische Aktivität von Bedeutung zu sein, sondern auch die Interaktion von HtrA1 mit anderen Proteinen, wie z.B. die Interaktion mit Tubulin über die PDZ-Domäne (Chien *et al.* 2009). Dementsprechend sollten in Zukunft außerdem die Interaktionspartner von HtrA1 innerhalb und außerhalb der Zelle identifiziert werden, um neue und genaue funktionelle Einsichten zu gewinnen.

Die Tatsache, dass MBD2 an den HtrA1-Promotor bindet, unterstützt die Bedeutung von MBD2 als potentiell Therapieziel. MBD2 reguliert außerdem die Genexpression verschiedener Tumorsuppressoren, darunter auch HtrA1, und inhibiert die Tumorigenese in APC^{Min/+}-Mäusen. Diese Eigenschaften machen es zu einem interessanten Angriffspunkt für neue Therapiestrategien. Bisher konzentrierte sich die Forschung eher auf die Beeinflussung der DNA-Methylierung selbst, was jedoch aufgrund der Nebenwirkungen auf normale Zellen mit einigen Bedenken verbunden ist. Aus diesem Grund wird inzwischen MBD2, welches das Methylierungssignal in ein Transkriptionsrepressionssignal übersetzt, als neuer

vielversprechender Angriffspunkt diskutiert. Therapeutisch interessant wären Substanzen, die die Interaktion von MBD2 mit der methylierten DNA oder dem rekrutierten Transkriptionsrepressorkomplex hemmen. Mittels eines weiteren HTS (*High Throughput Screen*), bei dem eine andere Substanzbibliothek getestet wird, könnten solche Substanzen identifiziert werden. Diese könnten dann biochemisch, zellbiologisch und *in vivo* analysiert werden.

Für MBD2 sind bisher keine Strukturinformationen verfügbar. Diese würden jedoch helfen, die Interaktion von MBD2 mit der DNA und dem Transkriptionsrepressorkomplex genau zu verstehen. Mit Hilfe dieser Informationen wäre es möglich Moleküle zu modellieren, die die Interaktion spezifisch stören.

MBD2 stellt ferner ein *in vitro* Substrat von HtrA1 dar. In der Vergangenheit wurde außerdem gezeigt, dass HtrA1 zum Teil im Zellkern lokalisiert ist (Clawson *et al.* 2008). Da MBD2 ebenfalls innerhalb des Zellkerns vorliegt, könnte es demnach potentiell *in vivo* von HtrA1 proteolysiert werden. Diese Fragestellung sollte in Zukunft genauer untersucht werden, um eine potentielle Bedeutung von HtrA1 für die Regulation der MBD2-Homöostase zu klären. Eine solche Funktion hätte dramatische Folgen für die Tumorprogression in Zellen, in denen die HtrA1-Expression abgeschaltet ist. Nach Verlust von HtrA1 würde MBD2 nicht mehr proteolysiert werden. Dementsprechend würde die Konzentration von MBD2 in der Zelle stark ansteigen und es könnte häufiger an die methylierten Promotoren von Tumorsuppressorgenen, u.a. von HtrA1, binden und deren Expression inhibieren. Diese Kaskade würde die Tumorprogression erheblich fördern. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung diese potentielle Funktion von HtrA1 in Zukunft näher zu analysieren.

6 Zusammenfassung

HtrA1 gehört zu der HtrA (*High temperature requirement*)-Familie der Serin-Proteasen, einer Gruppe hochkonservierter Proteasen, die sowohl eukaryotische, als auch prokaryotische Mitglieder umfasst. Gemeinsames Merkmal dieser Serinproteasen ist das Vorhandensein einer hoch-konservierten Trypsin-ähnlichen Domäne und mindestens einer PDZ-Domäne am C-Terminus. HtrA1 wurde ursprünglich als herunter reguliertes Gen in SV40-transfomierten Fibroblasten identifiziert und wurde seitdem mit verschiedenen Krankheitsbildern, wie z.B. Arthritis, altersbedingter Makuladegeneration und der Alzheimerschen Krankheit, in Verbindung gebracht.

HtrA1 ist außerdem für einige Krebsarten, wie z.B. Ovarialkarzinome, Melanome und Mesotheliome, von Bedeutung. Die Expression von HtrA1 ist in diesen Tumoren herunter reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mechanismus, der für die aberrante Verminderung der HtrA1-Expression in Tumorzellen verantwortlich ist, identifiziert. Der HtrA1-Promotor enthält eine *CpG island*, die in Kolonkarzinomzelllinien und Darmpolypen von APC^{Min/+}-Mäusen hypermethyliert ist. Diese Hypermethylierung korreliert mit der Inhibition der HtrA1-Expression. Damit konnte HtrA1 erstmals mit der Entstehung des Kolonkarzinoms in Verbindung gebracht werden. Durch Behandlung mit epigenetischen Pharmazeutika kann die Expression von HtrA1 in Zelllinien, die einen hypermethylierten HtrA1-Promotor aufweisen, wiederhergestellt werden. Demzufolge ist die DNA-Methylierung reversibel.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Suppression von MBD2, einem Mitglied der MBD-Proteinfamilie, die HtrA1-Expression in Zellen mit einem hypermethylierten HtrA1-Promotor gesteigert werden kann. In Zellen mit einem unmethylierten HtrA1-Promotor hat die MBD2-Suppression hingegen keinen Effekt. Demnach bindet MBD2 methylierungsabhängig an den Promotor und inhibiert die Transkription von HtrA1.

Aufgrund der Fähigkeit an die Promotoren von Tumorsuppressorgenen zu binden und der Tatsache, dass der Verlust von MBD2 in APC^{Min/+}-Mäusen die Tumorigenese stark vermindert, wird MBD2 als interessanter potentieller Angriffspunkt für die Etablierung neuer Therapiestrategien zur Behandlung von Krebserkrankungen angesehen.

Zusätzlich wurde die Interaktion von rekombinant hergestelltem MBD2b und DNA mit einem EMSA analysiert. Mit Hilfe des EMSAs konnte eine methylierungsabhängige Bindung des gereinigten MBD2s an DNA-Oligonucleotide nachgewiesen werden. Außerdem wurden Substanzen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Interaktion von MBD2b mit methylierter DNA zu

inhibieren, untersucht. Dabei konnte eine Substanz, die an die DNA bindet, als wirksamer Inhibitor der MBD2-Bindung identifiziert werden.

Mit Hilfe der Gelfiltration wurde außerdem untersucht, ob die Bindung von MBD2b an methylierte DNA den oligomeren Zustand von MBD2 beeinflusst. Dabei wurde erstmals eine oligomere Form von MBD2b identifiziert. Die funktionelle Bedeutung dieses Oligomers muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Weiterhin wurde analysiert, ob HtrA1 ein Substrat von MBD2b ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass HtrA1 in der Lage ist, MBD2 abzubauen. In Zukunft muss analysiert werden, ob HtrA1 MBD2 auch *in vivo* abbauen kann und somit eine Rolle in der Homöostase von MBD2 spielt.

In zellbiologischen Experimenten wurden außerdem die Auswirkungen der Re-Expression von HtrA1 in Kolonkarzinomzellen, die kein HtrA1 exprimieren, auf verschiedene zelluläre Prozesse untersucht. Zunächst wurde die Lokalisation von HtrA1 mikroskopisch analysiert. Dabei wurde HtrA1 intrazellulär und zu großen Teilen extrazellulär beobachtet.

Außerdem wurde die Auswirkung der Re-Expression auf die Migrationsfähigkeit der Zellen analysiert. Diese Experimente haben ergeben, dass die HtrA1-Expression mit einer verminderten Migrationsfähigkeit der Zellen einhergeht. Neben Zellwachstum und Zellproliferation spielt HtrA1 demzufolge auch eine Rolle in der Regulation der Zellmigration.

Die Tatsache, dass die HtrA1-Expression durch DNA-Methylierung in Tumorzelllinien reguliert wird und MBD2 das Methylierungssignal in die Transkriptionsrepression übersetzt, unterstützt die Bedeutung von HtrA1 als Tumorsuppressor. Die Identifikation des Mechanismus, der für die aberrante Verminderung der HtrA1-Expression in Tumorzellen verantwortlich ist, liefert außerdem neue Hinweise für die Etablierung von Therapiestrategien zur Behandlung von Krebserkrankungen. Außerdem konnte mit der HtrA1-vermittelten Inhibition der Zellmigration eine weitere tumorsuppressive Eigenschaft von HtrA1 identifiziert werden.

Literaturverzeichnis

- Ajayi, F., Kongoasa, N., Gaffey, T., Asmann, Y.W., Watson, W.J., Baldi, A., Lala, P., Shridhar, V., Brost, B. & Chien, J. 2008, "Elevated expression of serine protease HtrA1 in preeclampsia and its role in trophoblast cell migration and invasion", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 199, no. 5, pp. 557.e1-557.10.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R. & Mirsky, A.E. 1964, "Acetylation and Methylation of Histones and their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 51, pp. 786-794.
- Allis, C.D., Jenuwein, T. & Reinberg, D. 2007, *Epigenetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Balbin, M., Fueyo, A., Tester, A.M., Pendas, A.M., Pitiot, A.S., Astudillo, A., Overall, C.M., Shapiro, S.D. & Lopez-Otin, C. 2003, "Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice", *Nature genetics*, vol. 35, no. 3, pp. 252-257.
- Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F., Catricala, C., Amantea, A., Noonan, D.M., Albini, A., Natali, P.G., Lombardi, D. & Paggi, M.G. 2002, "The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells", *Oncogene*, vol. 21, no. 43, pp. 6684-8.
- Baldi, A., Mottolese, M., Vincenzi, B., Campioni, M., Mellone, P., Di Marino, M., di Crescenzo, V.G., Visca, P., Menegozzo, S., Spugnini, E.P., Citro, G., Ceribelli, A., Mirri, A., Chien, J., Shridhar, V., Ehrmann, M., Santini, M. & Facciolo, F. 2008, "The serine protease HtrA1 is a novel prognostic factor for human mesothelioma", *Pharmacogenomics*, vol. 9, no. 8, pp. 1069-1077.
- Ballestar, E. & Esteller, M. 2005, "Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger", *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, vol. 83, no. 3, pp. 374-384.
- Barr, H., Hermann, A., Berger, J., Tsai, H.H., Adie, K., Prokhortchouk, A., Hendrich, B. & Bird, A. 2007, "Mbd2 contributes to DNA methylation-directed repression of the Xist gene", *Mol Cell Biol*, vol. 27, no. 10, pp. 3750-7.
- Beamish, H., Warrenner, R. & Gabrielli, B.G. 2004, "Analysis of checkpoint responses to histone deacetylase inhibitors", *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 281, pp. 245-259.
- Bellacosa, A. 2001, "Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer", *Journal of cellular physiology*, vol. 187, no. 2, pp. 137-144.
- Bellacosa, A., Cicchillitti, L., Schepis, F., Riccio, A., Yeung, A.T., Matsumoto, Y., Golemis, E.A., Genuardi, M. & Neri, G. 1999, "MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 7, pp. 3969-3974.

- Berger, J. & Bird, A. 2005, "Role of MBD2 in gene regulation and tumorigenesis", *Biochem Soc Trans*, vol. 33, no. Pt 6, pp. 1537-40.
- Bernard, D., Gil, J., Dumont, P., Rizzo, S., Monte, D., Quatannens, B., Hudson, D., Visakorpi, T., Fuks, F. & de Launoit, Y. 2006, "The methyl-CpG-binding protein MECP2 is required for prostate cancer cell growth", *Oncogene*, vol. 25, no. 9, pp. 1358-1366.
- Bhattacharya, S.K., Ramchandani, S., Cervoni, N. & Szyf, M. 1999, "A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA", *Nature*, vol. 397, no. 6720, pp. 579-583.
- Biel, M., Wascholowski, V. & Giannis, A. 2005, "Epigenetics--an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes", *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 44, no. 21, pp. 3186-216.
- Bird, A. 2002, "DNA methylation patterns and epigenetic memory", *Genes Dev*, vol. 16, no. 1, pp. 6-21.
- Bird, A.P. 1986, "CpG-rich islands and the function of DNA methylation", *Nature*, vol. 321, no. 6067, pp. 209-213.
- Bird, A.P. & Wolffe, A.P. 1999, "Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin", *Cell*, vol. 99, no. 5, pp. 451-454.
- Blagosklonny, M.V., Schulte, T., Nguyen, P., Trepel, J. & Neckers, L.M. 1996, "Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway", *Cancer research*, vol. 56, no. 8, pp. 1851-1854.
- Bock, C., Reither, S., Mikeska, T., Paulsen, M., Walter, J. & Lengauer, T. 2005, "BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing", *Bioinformatics (Oxford, England)*, vol. 21, no. 21, pp. 4067-4068.
- Borgono, C.A. & Diamandis, E.P. 2004, "The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer", *Nature reviews.Cancer*, vol. 4, no. 11, pp. 876-890.
- Bowden, M., Drummond, A.E., Salamonsen, L.A., Findlay, J.K. & Nie, G. 2009, "Evolutionary conservation of mammalian HTRA3 and its developmental regulation in the rat ovary", *Journal of experimental zoology.Part B.Molecular and developmental evolution*, .
- Bowden, M.A., Di Nezza-Cossens, L.A., Jobling, T., Salamonsen, L.A. & Nie, G. 2006, "Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer", *Gynecologic oncology*, vol. 103, no. 1, pp. 253-260.
- Boyden, S. 1962, "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes", *The Journal of experimental medicine*, vol. 115, pp. 453-466.
- Brattain, M.G., Fine, W.D., Khaled, F.M., Thompson, J. & Brattain, D.E. 1981, "Heterogeneity of malignant cells from a human Kolonic carcinoma", *Cancer research*, vol. 41, no. 5, pp. 1751-1756.

- Campbell, P.M., Bovenzi, V. & Szyf, M. 2004, "Methylated DNA-binding protein 2 antisense inhibitors suppress tumorigenesis of human cancer cell lines in vitro and in vivo", *Carcinogenesis*, vol. 25, no. 4, pp. 499-507.
- Carragher, N.O. & Frame, M.C. 2002, "Calpain: a role in cell transformation and migration", *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 34, no. 12, pp. 1539-1543.
- Chatagnon, A., Bougel, S., Perriaud, L., Lachuer, J., Benhattar, J. & Dante, R. 2009, "Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancer cells", *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 1, pp. 28-34.
- Chien, J., Aletti, G., Baldi, A., Catalano, V., Muretto, P., Keeney, G.L., Kalli, K.R., Staub, J., Ehrmann, M., Cliby, W.A., Lee, Y.K., Bible, K.C., Hartmann, L.C., Kaufmann, S.H. & Shridhar, V. 2006, "Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity", *J Clin Invest*, vol. 116, no. 7, pp. 1994-2004.
- Chien, J., Ota, T., Aletti, G., Shridhar, R., Boccellino, M., Quagliuolo, L., Baldi, A. & Shridhar, V. 2009, "Serine protease HtrA1 associates with microtubules and inhibits cell migration", *Molecular and cellular biology*, vol. 29, no. 15, pp. 4177-4187.
- Chien, J., Staub, J., Hu, S.I., Erickson-Johnson, M.R., Couch, F.J., Smith, D.I., Crowl, R.M., Kaufmann, S.H. & Shridhar, V. 2004, "A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer", *Oncogene*, vol. 23, no. 8, pp. 1636-1644.
- Christman, J.K. 2002, "5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy", *Oncogene*, vol. 21, no. 35, pp. 5483-95.
- Clausen, T., Southan, C. & Ehrmann, M. 2002, "The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate", *Mol Cell*, vol. 10, no. 3, pp. 443-55.
- Clawson, G.A., Bui, V., Xin, P., Wang, N. & Pan, W. 2008, "Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins", *Journal of cellular biochemistry*, vol. 105, no. 1, pp. 81-88.
- Costello, J.F., Fruhwald, M.C., Smiraglia, D.J., Rush, L.J., Robertson, G.P., Gao, X., Wright, F.A., Feramisco, J.D., Peltomaki, P., Lang, J.C., Schuller, D.E., Yu, L., Bloomfield, C.D., Caligiuri, M.A., Yates, A., Nishikawa, R., Su Huang, H., Petrelli, N.J., Zhang, X., O'Dorisio, M.S., Held, W.A., Cavenee, W.K. & Plass, C. 2000, "Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns", *Nature genetics*, vol. 24, no. 2, pp. 132-138.
- Crawford, Y.G., Gauthier, M.L., Joubel, A., Mantei, K., Kozakiewicz, K., Afshari, C.A. & Tlsty, T.D. 2004, "Histologically normal human mammary epithelia with silenced p16(INK4a) overexpress COX-2, promoting a premalignant program", *Cancer cell*, vol. 5, no. 3, pp. 263-273.
- Damiani, L.A., Yingling, C.M., Leng, S., Romo, P.E., Nakamura, J. & Belinsky, S.A. 2008, "Carcinogen-induced gene promoter hypermethylation is mediated by DNMT1 and causal for transformation of immortalized bronchial epithelial cells", *Cancer research*, vol. 68, no. 21, pp. 9005-9014.

- Daniel, J.M., Spring, C.M., Crawford, H.C., Reynolds, A.B. & Baig, A. 2002, "The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides", *Nucleic acids research*, vol. 30, no. 13, pp. 2911-2919.
- De Luca, A., De Falco, M., Fedele, V., Cobellis, L., Mastrogiacomo, A., Laforgia, V., Tuduce, I.L., Campioni, M., Giraldi, D., Paggi, M.G. & Baldi, A. 2004, "The serine protease HtrA1 is upregulated in the human placenta during pregnancy", *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, vol. 52, no. 7, pp. 885-892.
- Dewan, A., Liu, M., Hartman, S., Zhang, S., Liu, D.T., Zhao, C., Tam, P.O., Chan, W.M., Lam, D.S., Snyder, M., Barnstable, C., Pang, C.P. & Hoh, J. 2006, "HTRA1 Promoter Polymorphism in Wet Age-Related Macular Degeneration", *Science*, .
- Eads, C.A., Nickel, A.E. & Laird, P.W. 2002, "Complete genetic suppression of polyp formation and reduction of CpG-island hypermethylation in Apc(Min/+) Dnmt1-hypomorphic Mice", *Cancer Res*, vol. 62, no. 5, pp. 1296-9.
- Egeblad, M. & Werb, Z. 2002, "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression", *Nature reviews.Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 161-174.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P.A. 2004, "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy", *Nature*, vol. 429, no. 6990, pp. 457-463.
- Esteller, M. 2007, "Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps", *Nature reviews.Genetics*, vol. 8, no. 4, pp. 286-298.
- Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B. & Herman, J.G. 2001a, "A gene hypermethylation profile of human cancer", *Cancer research*, vol. 61, no. 8, pp. 3225-3229.
- Esteller, M., Fraga, M.F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A.K., Trojan, J., Vaur-Barriere, C., Bignon, Y.J., Ramus, S., Benitez, J., Caldes, T., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Launonen, V., Canal, M.J., Rodriguez, R., Capella, G., Peinado, M.A., Borg, A., Aaltonen, L.A., Ponder, B.A., Baylin, S.B. & Herman, J.G. 2001b, "DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis", *Human molecular genetics*, vol. 10, no. 26, pp. 3001-3007.
- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., Volinia, S., Guler, G., Morrison, C.D., Chan, K.K., Marcucci, G., Calin, G.A., Huebner, K. & Croce, C.M. 2007, "MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 40, pp. 15805-15810.
- Fatemi, M. & Wade, P.A. 2006, "MBD family proteins: reading the epigenetic code", *J Cell Sci*, vol. 119, no. Pt 15, pp. 3033-7.
- Fearnhead, N.S., Britton, M.P. & Bodmer, W.F. 2001, "The ABC of APC", *Hum Mol Genet*, vol. 10, no. 7, pp. 721-33.

- Fearon, E.R. & Vogelstein, B. 1990, "A genetic model for colorectal tumorigenesis", *Cell*, vol. 61, no. 5, pp. 759-767.
- Feinberg, A.P., Ohlsson, R. & Henikoff, S. 2006, "The epigenetic progenitor origin of human cancer", *Nature reviews.Genetics*, vol. 7, no. 1, pp. 21-33.
- Feinberg, A.P. & Tycko, B. 2004, "The history of cancer epigenetics", *Nature reviews.Cancer*, vol. 4, no. 2, pp. 143-153.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. 1983, "Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts", *Nature*, vol. 301, no. 5895, pp. 89-92.
- Fischer, A. 1946, "A Mechanism of the proteolytic activity of malignant tissue cells", *Nature*, vol. 157, pp. 442.
- Flatmark, K., Nome, R.V., Folkvord, S., Bratland, A., Rasmussen, H., Ellefsen, M.S., Fodstad, O. & Ree, A.H. 2006, "Radiosensitization of colorectal carcinoma cell lines by histone deacetylase inhibition", *Radiation oncology (London, England)*, vol. 1, pp. 25.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Montoya, G., Taysavang, P., Wade, P.A. & Esteller, M. 2003, "The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties", *Nucleic acids research*, vol. 31, no. 6, pp. 1765-1774.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. & Paul, C.L. 1992, "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, no. 5, pp. 1827-31.
- Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Tsuruzoe, S., Shinkai, Y., Tachibana, M., Chiba, T. & Nakao, M. 2003, "Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 26, pp. 24132-24138.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P. & Kouzarides, T. 2003, "The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 6, pp. 4035-4040.
- Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. 1987, "CpG islands in vertebrate genomes", *Journal of Molecular Biology*, vol. 196, no. 2, pp. 261-282.
- Garofalo, A., Chirivi, R.G., Scanziani, E., Mayo, J.G., Vecchi, A. & Giavazzi, R. 1993, "Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe combined immunodeficient mice", *Invasion & metastasis*, vol. 13, no. 2, pp. 82-91.
- Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H. & Jaenisch, R. 2003, "Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 300, no. 5618, pp. 489-492.
- Goelz, S.E., Vogelstein, B., Hamilton, S.R. & Feinberg, A.P. 1985, "Hypomethylation of DNA from benign and malignant human Kolon neoplasms", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 228, no. 4696, pp. 187-190.

- Goldberg, A.D., Allis, C.D. & Bernstein, E. 2007, "Epigenetics: a landscape takes shape", *Cell*, vol. 128, no. 4, pp. 635-8.
- Goll, M.G. & Bestor, T.H. 2005, "Eukaryotic cytosine methyltransferases", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 74, pp. 481-514.
- Goodman, O.B., Jr, Febbraio, M., Simantov, R., Zheng, R., Shen, R., Silverstein, R.L. & Nanus, D.M. 2006, "Neprilysin inhibits angiogenesis via proteolysis of fibroblast growth factor-2", *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 44, pp. 33597-33605.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. 1977, "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5", *The Journal of general virology*, vol. 36, no. 1, pp. 59-74.
- Grau, S., Baldi, A., Bussani, R., Tian, X., Stefanescu, R., Przybylski, M., Richards, P., Jones, S.A., Shridhar, V., Clausen, T. & Ehrmann, M. 2005, "Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 17, pp. 6021-6.
- Grau, S., Richards, P.J., Kerr, B., Hughes, C., Caterson, B., Williams, A.S., Junker, U., Jones, S.A., Clausen, T. & Ehrmann, M. 2006, "The role of human HtrA1 in arthritic disease", *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 10, pp. 6124-6129.
- Gupta, S., Singh, R., Datta, P., Zhang, Z., Orr, C., Lu, Z., Dubois, G., Zervos, A.S., Meisler, M.H., Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E.S. 2004, "The C-terminal tail of presenilin regulates Omi/HtrA2 protease activity", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 44, pp. 45844-45854.
- Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J.E. & Bird, A. 2001, "A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome", *Nature genetics*, vol. 27, no. 3, pp. 322-326.
- Hahn, M.A., Hahn, T., Lee, D.H., Esworthy, R.S., Kim, B.W., Riggs, A.D., Chu, F.F. & Pfeifer, G.P. 2008, "Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation", *Cancer research*, vol. 68, no. 24, pp. 10280-10289.
- Hanahan, D. 1983, "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids", *Journal of Molecular Biology*, vol. 166, no. 4, pp. 557-580.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2000, "The hallmarks of cancer", *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57-70.
- Hara, K., Shiga, A., Fukutake, T., Nozaki, H., Miyashita, A., Yokoseki, A., Kawata, H., Koyama, A., Arima, K., Takahashi, T., Ikeda, M., Shiota, H., Tamura, M., Shimoe, Y., Hirayama, M., Arisato, T., Yanagawa, S., Tanaka, A., Nakano, I., Ikeda, S., Yoshida, Y., Yamamoto, T., Ikeuchi, T., Kuwano, R., Nishizawa, M., Tsuji, S. & Onodera, O. 2009, "Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease", *The New England journal of medicine*, vol. 360, no. 17, pp. 1729-1739.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E.S. 2002, "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of

- apoptosis protein-caspase interaction", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 1, pp. 432-438.
- Hendrich, B. & Bird, A. 1998, "Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins", *Mol Cell Biol*, vol. 18, no. 11, pp. 6538-47.
- Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V.A. & Bird, A. 2001, "Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development", *Genes & development*, vol. 15, no. 6, pp. 710-723.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.H., Jiricny, J. & Bird, A. 1999, "The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites", *Nature*, vol. 401, no. 6750, pp. 301-304.
- Ho, K.L., McNae, I.W., Schmiedeberg, L., Klose, R.J., Bird, A.P. & Walkinshaw, M.D. 2008, "MeCP2 binding to DNA depends upon hydration at methyl-CpG", *Molecular cell*, vol. 29, no. 4, pp. 525-531.
- Hochedlinger, K., Blelloch, R., Brennan, C., Yamada, Y., Kim, M., Chin, L. & Jaenisch, R. 2004, "Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation", *Genes & development*, vol. 18, no. 15, pp. 1875-1885.
- Hoeller, D., Hecker, C.M. & Dikic, I. 2006, "Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis", *Nature reviews.Cancer*, vol. 6, no. 10, pp. 776-788.
- Holler, M., Westin, G., Jiricny, J. & Schaffner, W. 1988, "Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated", *Genes & development*, vol. 2, no. 9, pp. 1127-1135.
- Holst, C.R., Nuovo, G.J., Esteller, M., Chew, K., Baylin, S.B., Herman, J.G. & Tlsty, T.D. 2003, "Methylation of p16(INK4a) promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia", *Cancer research*, vol. 63, no. 7, pp. 1596-1601.
- Houghton, A.M., Grisolo, J.L., Baumann, M.L., Kobayashi, D.K., Hautamaki, R.D., Nehring, L.C., Cornelius, L.A. & Shapiro, S.D. 2006, "Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases", *Cancer research*, vol. 66, no. 12, pp. 6149-6155.
- Hutchins, A.S., Mullen, A.C., Lee, H.W., Sykes, K.J., High, F.A., Hendrich, B.D., Bird, A.P. & Reiner, S.L. 2002, "Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator", *Mol Cell*, vol. 10, no. 1, pp. 81-91.
- Issa, J.P., Ottaviano, Y.L., Celano, P., Hamilton, S.R., Davidson, N.E. & Baylin, S.B. 1994, "Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human Kolon", *Nature genetics*, vol. 7, no. 4, pp. 536-540.
- Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E. & Jaenisch, R. 2001, "Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation", *Nature genetics*, vol. 27, no. 1, pp. 31-39.

- Jenuwein, T. & Allis, C.D. 2001, "Translating the histone code", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 293, no. 5532, pp. 1074-1080.
- Jones, P.A. 1999, "The DNA methylation paradox", *Trends in genetics : TIG*, vol. 15, no. 1, pp. 34-37.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B. 2007, "The epigenomics of cancer", *Cell*, vol. 128, no. 4, pp. 683-92.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B. 2002, "The fundamental role of epigenetic events in cancer", *Nat Rev Genet*, vol. 3, no. 6, pp. 415-28.
- Jones, P.A. & Taylor, S.M. 1980, "Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation", *Cell*, vol. 20, no. 1, pp. 85-93.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J. & Wolffe, A.P. 1998, "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription", *Nature genetics*, vol. 19, no. 2, pp. 187-191.
- Jost, M., Folgueras, A.R., Frerart, F., Pendas, A.M., Blacher, S., Houard, X., Berndt, S., Munaut, C., Cataldo, D., Alvarez, J., Melen-Lamalle, L., Foidart, J.M., Lopez-Otin, C. & Noel, A. 2006, "Earlier onset of tumoral angiogenesis in matrix metalloproteinase-19-deficient mice", *Cancer research*, vol. 66, no. 10, pp. 5234-5241.
- Kantarjian, H., Issa, J.P., Rosenfeld, C.S., Bennett, J.M., Albitar, M., DiPersio, J., Klimek, V., Slack, J., de Castro, C., Ravandi, F., Helmer, R., 3rd, Shen, L., Nimer, S.D., Leavitt, R., Raza, A. & Saba, H. 2006, "Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study", *Cancer*, vol. 106, no. 8, pp. 1794-1803.
- Kantarjian, H.M. & Issa, J.P. 2005, "Decitabine dosing schedules", *Seminars in hematology*, vol. 42, no. 3 Suppl 2, pp. S17-22.
- Khorasanizadeh, S. 2004, "The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation", *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 259-272.
- Kim, G.D., Ni, J., Kelesoglu, N., Roberts, R.J. & Pradhan, S. 2002, "Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases", *The EMBO journal*, vol. 21, no. 15, pp. 4183-4195.
- Kim, M., Trinh, B.N., Long, T.I., Oghamian, S. & Laird, P.W. 2004, "Dnmt1 deficiency leads to enhanced microsatellite instability in mouse embryonic stem cells", *Nucleic acids research*, vol. 32, no. 19, pp. 5742-5749.
- Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. 1997, "Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers", *Nature*, vol. 386, no. 6627, pp. 761, 763.
- Kirschmann, D.A., Lininger, R.A., Gardner, L.M., Seftor, E.A., Odero, V.A., Ainsztein, A.M., Earnshaw, W.C., Wallrath, L.L. & Hendrix, M.J. 2000, "Down-regulation of HP1Hsalph expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer", *Cancer research*, vol. 60, no. 13, pp. 3359-3363.

- Klose, R.J. & Bird, A.P. 2006, "Genomic DNA methylation: the mark and its mediators", *Trends in biochemical sciences*, vol. 31, no. 2, pp. 89-97.
- Kolmar, H., Waller, P.R. & Sauer, R.T. 1996, "The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation", *Journal of Bacteriology*, vol. 178, no. 20, pp. 5925-5929.
- Kornberg, R.D. & Lorch, Y. 1999, "Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome", *Cell*, vol. 98, no. 3, pp. 285-294.
- Kouidou, S., Malousi, A. & Maglaveras, N. 2006, "Methylation and repeats in silent and nonsense mutations of p53", *Mutation research*, vol. 599, no. 1-2, pp. 167-177.
- Krojer, T., Pangerl, K., Kurt, J., Sawa, J., Stingl, C., Mechtler, K., Huber, R., Ehrmann, M. & Clausen, T. 2008, "Interplay of PDZ and protease domain of DegP ensures efficient elimination of misfolded proteins", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 22, pp. 7702-7707.
- Kumar, N. 1981, "Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action", *The Journal of biological chemistry*, vol. 256, no. 20, pp. 10435-10441.
- Lao, V.V., Herring, J.L., Kim, C.H., Darwanto, A., Soto, U. & Sowers, L.C. 2009, "Incorporation of 5-chlorocytosine into mammalian DNA results in heritable gene silencing and altered cytosine methylation patterns", *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 5, pp. 886-893.
- Leibovitz, A., Stinson, J.C., McCombs, W.B., 3rd, McCoy, C.E., Mazur, K.C. & Mabry, N.D. 1976, "Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines", *Cancer research*, vol. 36, no. 12, pp. 4562-4569.
- Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F. & Bird, A. 1992, "Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA", *Cell*, vol. 69, no. 6, pp. 905-914.
- Li, E., Bestor, T.H. & Jaenisch, R. 1992, "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality", *Cell*, vol. 69, no. 6, pp. 915-926.
- Li, W., Srinivasula, S.M., Chai, J., Li, P., Wu, J.W., Zhang, Z., Alnemri, E.S. & Shi, Y. 2002, "Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi", *Nature structural biology*, vol. 9, no. 6, pp. 436-441.
- Lin, H., Yamada, Y., Nguyen, S., Linhart, H., Jackson-Grusby, L., Meissner, A., Meletis, K., Lo, G. & Jaenisch, R. 2006, "Suppression of intestinal neoplasia by deletion of Dnmt3b", *Molecular and cellular biology*, vol. 26, no. 8, pp. 2976-2983.
- Lopez-Otin, C. & Matrisian, L.M. 2007, "Emerging roles of proteases in tumour suppression", *Nat Rev Cancer*, vol. 7, no. 10, pp. 800-8.
- Lopez-Otin, C. & Overall, C.M. 2002, "Protease degradomics: a new challenge for proteomics", *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 3, no. 7, pp. 509-519.

- Lopez-Serra, L., Ballestar, E., Fraga, M.F., Alaminos, M., Setien, F. & Esteller, M. 2006, "A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer", *Cancer research*, vol. 66, no. 17, pp. 8342-8346.
- Lotem, J. & Sachs, L. 2002, "Epigenetics wins over genetics: induction of differentiation in tumor cells", *Seminars in cancer biology*, vol. 12, no. 5, pp. 339-346.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J. 1997, "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution", *Nature*, vol. 389, no. 6648, pp. 251-260.
- Magdinier, F. & Wolffe, A.P. 2001, "Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 9, pp. 4990-5.
- Margueron, R., Trojer, P. & Reinberg, D. 2005, "The key to development: interpreting the histone code?", *Current opinion in genetics & development*, vol. 15, no. 2, pp. 163-176.
- Marino, G., Salvador-Montoliu, N., Fueyo, A., Knecht, E., Mizushima, N. & Lopez-Otin, C. 2007, "Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3", *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 25, pp. 18573-18583.
- Marshall, O.J. 2004, "PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR", *Bioinformatics*, vol. 20, no. 15, pp. 2471-2.
- Martin, V., Jorgensen, H.F., Chaubert, A.S., Berger, J., Barr, H., Shaw, P., Bird, A. & Chaubert, P. 2008, "MBD2-mediated transcriptional repression of the p14ARF tumor suppressor gene in human Colon cancer cells", *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, vol. 75, no. 5, pp. 281-287.
- Martins, L.M. 2002, "The serine protease Omi/HtrA2: a second mammalian protein with a Reaper-like function", *Cell death and differentiation*, vol. 9, no. 7, pp. 699-701.
- Massoumi, R., Chmielarska, K., Hennecke, K., Pfeifer, A. & Fassler, R. 2006, "Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling", *Cell*, vol. 125, no. 4, pp. 665-677.
- McCawley, L.J., Crawford, H.C., King, L.E., Jr, Mudgett, J. & Matrisian, L.M. 2004, "A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma", *Cancer research*, vol. 64, no. 19, pp. 6965-6972.
- Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L. & Bird, A.P. 1989, "Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs", *Cell*, vol. 58, no. 3, pp. 499-507.
- Millar, C.B., Guy, J., Sansom, O.J., Selfridge, J., MacDougall, E., Hendrich, B., Keightley, P.D., Bishop, S.M., Clarke, A.R. & Bird, A. 2002, "Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice", *Science (New York, N. Y.)*, vol. 297, no. 5580, pp. 403-405.

- Mitchell, B.S. & Schumacher, U. 1997, "Use of immunodeficient mice in metastasis research", *British journal of biomedical science*, vol. 54, no. 4, pp. 278-286.
- Mohamed, M.M. & Sloane, B.F. 2006, "Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer", *Nature reviews.Cancer*, vol. 6, no. 10, pp. 764-775.
- Mohandas, T., Sparkes, R.S. & Shapiro, L.J. 1981, "Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 211, no. 4480, pp. 393-396.
- Moser, A.R., Pitot, H.C. & Dove, W.F. 1990, "A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 247, no. 4940, pp. 322-324.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. 1992, "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986", *Biotechnology (Reading, Mass.)*, vol. 24, pp. 17-27.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. & Bird, A. 1998, "Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex", *Nature*, vol. 393, no. 6683, pp. 386-389.
- Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. & Bird, A. 1999, "MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex", *Nat Genet*, vol. 23, no. 1, pp. 58-61.
- Nguyen, C., Liang, G., Nguyen, T.T., Tsao-Wei, D., Groshen, S., Lubbert, M., Zhou, J.H., Benedict, W.F. & Jones, P.A. 2001, "Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation in normal and neoplastic cells", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 93, no. 19, pp. 1465-1472.
- Nie, G., Li, Y., Hale, K., Okada, H., Manuelpillai, U., Wallace, E.M. & Salamonsen, L.A. 2006, "Serine peptidase HTRA3 is closely associated with human placental development and is elevated in pregnancy serum", *Biology of reproduction*, vol. 74, no. 2, pp. 366-374.
- Nie, G.Y., Hampton, A., Li, Y., Findlay, J.K. & Salamonsen, L.A. 2003, "Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2", *The Biochemical journal*, vol. 371, no. Pt 1, pp. 39-48.
- O'Hagan, H.M., Mohammad, H.P. & Baylin, S.B. 2008, "Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island", *PLoS genetics*, vol. 4, no. 8, pp. e1000155.
- Ohki, I., Shimotake, N., Fujita, N., Jee, J., Ikegami, T., Nakao, M. & Shirakawa, M. 2001, "Solution structure of the methyl-CpG binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA", *Cell*, vol. 105, no. 4, pp. 487-97.
- Ohki, I., Shimotake, N., Fujita, N., Nakao, M. & Shirakawa, M. 1999, "Solution structure of the methyl-CpG-binding domain of the methylation-dependent transcriptional repressor MBD1", *The EMBO journal*, vol. 18, no. 23, pp. 6653-6661.

- Oka, C., Tsujimoto, R., Kajikawa, M., Koshiba-Takeuchi, K., Ina, J., Yano, M., Tsuchiya, A., Ueta, Y., Soma, A., Kanda, H., Matsumoto, M. & Kawaichi, M. 2004, "HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins", *Development*, vol. 131, no. 5, pp. 1041-53.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. & Li, E. 1999, "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development", *Cell*, vol. 99, no. 3, pp. 247-257.
- Overall, C.M. & Kleifeld, O. 2006, "Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy", *Nature reviews.Cancer*, vol. 6, no. 3, pp. 227-239.
- Pallen, M.J. & Wren, B.W. 1997, "The HtrA family of serine proteases", *Molecular microbiology*, vol. 26, no. 2, pp. 209-221.
- Park, H.J., Kim, S.S., Seong, Y.M., Kim, K.H., Goo, H.G., Yoon, E.J., Min do, S., Kang, S. & Rhim, H. 2006, "Beta-amyloid precursor protein is a direct cleavage target of HtrA2 serine protease. Implications for the physiological function of HtrA2 in the mitochondria", *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 45, pp. 34277-34287.
- Paz, M.F., Fraga, M.F., Avila, S., Guo, M., Pollan, M., Herman, J.G. & Esteller, M. 2003a, "A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines", *Cancer research*, vol. 63, no. 5, pp. 1114-1121.
- Paz, M.F., Wei, S., Cigudosa, J.C., Rodriguez-Perales, S., Peinado, M.A., Huang, T.H. & Esteller, M. 2003b, "Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in Kolon cancer cells deficient in DNA methyltransferases", *Human molecular genetics*, vol. 12, no. 17, pp. 2209-2219.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L. 2002, "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR", *Nucleic acids research*, vol. 30, no. 9, pp. e36.
- Presse, T.J., Parry, L., Reed, K.R., Ewan, K.B., Dale, T.C., Sansom, O.J. & Clarke, A.R. 2008, "Deficiency of Mbd2 attenuates Wnt signaling", *Molecular and cellular biology*, vol. 28, no. 19, pp. 6094-6103.
- Plumb, J.A., Strathdee, G., Sludden, J., Kaye, S.B. & Brown, R. 2000, "Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter", *Cancer Res*, vol. 60, no. 21, pp. 6039-44.
- Ponten, J. & Macintyre, E.H. 1968, "Long term culture of normal and neoplastic human glia", *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, vol. 74, no. 4, pp. 465-486.
- Prokhortchouk, A., Sansom, O., Selfridge, J., Caballero, I.M., Salozhin, S., Aithozhina, D., Cerchiatti, L., Meng, F.G., Augenlicht, L.H., Mariadason, J.M., Hendrich, B., Melnick, A., Prokhortchouk, E., Clarke, A. & Bird, A. 2006, "Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer", *Molecular and cellular biology*, vol. 26, no. 1, pp. 199-208.
- Puente, X.S. & Lopez-Otin, C. 2004, "A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors", *Genome research*, vol. 14, no. 4, pp. 609-622.

- Pulukuri, S.M. & Rao, J.S. 2006, "CpG island promoter methylation and silencing of 14-3-3sigma gene expression in LNCaP and Tramp-C1 prostate cancer cell lines is associated with methyl-CpG-binding protein MBD2", *Oncogene*, vol. 25, no. 33, pp. 4559-72.
- Ramirez-Montagut, T., Blachere, N.E., Sviderskaya, E.V., Bennett, D.C., Rettig, W.J., Garin-Chesa, P. & Houghton, A.N. 2004, "FAPalpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor", *Oncogene*, vol. 23, no. 32, pp. 5435-5446.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. & Jenuwein, T. 2000, "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases", *Nature*, vol. 406, no. 6796, pp. 593-599.
- Rhee, I., Bachman, K.E., Park, B.H., Jair, K.W., Yen, R.W., Schuebel, K.E., Cui, H., Feinberg, A.P., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Baylin, S.B. & Vogelstein, B. 2002, "DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells", *Nature*, vol. 416, no. 6880, pp. 552-556.
- Rhee, I., Jair, K.W., Yen, R.W., Lengauer, C., Herman, J.G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Baylin, S.B. & Schuebel, K.E. 2000, "CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1", *Nature*, vol. 404, no. 6781, pp. 1003-1007.
- Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. 2000, "EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite", *Trends in genetics : TIG*, vol. 16, no. 6, pp. 276-277.
- Rodenhiser, D. & Mann, M. 2006, "Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications", *Cmaj*, vol. 174, no. 3, pp. 341-8.
- Rosenberg, B. 1973, "Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy", *Die Naturwissenschaften*, vol. 60, no. 9, pp. 399-406.
- Rowley, J.D. 1990, "The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia", *Cancer*, vol. 65, no. 10, pp. 2178-2184.
- Sachs, L. 1986, "Hematopoietic growth and differentiation factors and the reversibility of malignancy: cell differentiation and by-passing of genetic defects in leukemia", *Medical oncology and tumor pharmacotherapy*, vol. 3, no. 3-4, pp. 165-176.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, no. 12, pp. 5463-5467.
- Sansom, O.J., Berger, J., Bishop, S.M., Hendrich, B., Bird, A. & Clarke, A.R. 2003, "Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis", *Nat Genet*, vol. 34, no. 2, pp. 145-7.
- Sansom, O.J., Bishop, S.M., Bird, A. & Clarke, A.R. 2005, "MBD2 deficiency does not accelerate p53 mediated lymphomagenesis", *Oncogene*, vol. 24, no. 14, pp. 2430-2432.

- Sansom, O.J., Maddison, K. & Clarke, A.R. 2007, "Mechanisms of disease: methyl-binding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer", *Nat Clin Pract Oncol*, vol. 4, no. 5, pp. 305-15.
- Sharpless, N.E. & DePinho, R.A. 2004, "Telomeres, stem cells, senescence, and cancer", *The Journal of clinical investigation*, vol. 113, no. 2, pp. 160-168.
- Sheikhnejad, G., Brank, A., Christman, J.K., Goddard, A., Alvarez, E., Ford, H., Jr, Marquez, V.E., Marasco, C.J., Sufrin, J.R., O'gara, M. & Cheng, X. 1999, "Mechanism of inhibition of DNA (cytosine C5)-methyltransferases by oligodeoxyribonucleotides containing 5,6-dihydro-5-azacytosine", *Journal of Molecular Biology*, vol. 285, no. 5, pp. 2021-2034.
- Shridhar, V., Sen, A., Chien, J., Staub, J., Avula, R., Kovats, S., Lee, J., Lillie, J. & Smith, D.I. 2002, "Identification of underexpressed genes in early- and late-stage primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization", *Cancer Res*, vol. 62, no. 1, pp. 262-70.
- Smiraglia, D.J., Rush, L.J., Fruhwald, M.C., Dai, Z., Held, W.A., Costello, J.F., Lang, J.C., Eng, C., Li, B., Wright, F.A., Caligiuri, M.A. & Plass, C. 2001, "Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies", *Human molecular genetics*, vol. 10, no. 13, pp. 1413-1419.
- Spiess, C., Beil, A. & Ehrmann, M. 1999, "A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein", *Cell*, vol. 97, no. 3, pp. 339-347.
- Spotswood, H.T. & Turner, B.M. 2002, "An increasingly complex code", *The Journal of clinical investigation*, vol. 110, no. 5, pp. 577-582.
- Staub, J., Chien, J., Pan, Y., Qian, X., Narita, K., Aletti, G., Scheerer, M., Roberts, L.R., Molina, J. & Shridhar, V. 2007, "Epigenetic silencing of HSulf-1 in ovarian cancer: implications in chemoresistance", *Oncogene*, .
- Strahl, B.D. & Allis, C.D. 2000, "The language of covalent histone modifications", *Nature*, vol. 403, no. 6765, pp. 41-45.
- Strathdee, G., MacKean, M.J., Illand, M. & Brown, R. 1999, "A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer", *Oncogene*, vol. 18, no. 14, pp. 2335-2341.
- Strauss, K.M., Martins, L.M., Plun-Favreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Muller, T., Bornemann, A., Wolburg, H., Downward, J., Riess, O., Schulz, J.B. & Kruger, R. 2005, "Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease", *Human molecular genetics*, vol. 14, no. 15, pp. 2099-2111.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. 1986, "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes", *Journal of Molecular Biology*, vol. 189, no. 1, pp. 113-130.
- Stupack, D.G., Teitz, T., Potter, M.D., Mikolon, D., Houghton, P.J., Kidd, V.J., Lahti, J.M. & Cheresch, D.A. 2006, "Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8", *Nature*, vol. 439, no. 7072, pp. 95-99.

- Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J.G. & Baylin, S.B. 2004, "Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer", *Nature genetics*, vol. 36, no. 4, pp. 417-422.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V.A., Behm, F.G., Look, A.T., Lahti, J.M. & Kidd, V.J. 2000, "Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN", *Nature medicine*, vol. 6, no. 5, pp. 529-535.
- Tocharus, J., Tsuchiya, A., Kajikawa, M., Ueta, Y., Oka, C. & Kawaichi, M. 2004, "Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF-beta signaling", *Dev Growth Differ*, vol. 46, no. 3, pp. 257-74.
- Tsuji, N., Nagashima, K., Kobayashi, M., Wakisaka, Y. & Kawamura, Y. 1976, "Two new antibiotics, A-218 and K-41. Isolation and characterization", *The Journal of antibiotics*, vol. 29, no. 1, pp. 10-14.
- Turner, B.M. 2002, "Cellular memory and the histone code", *Cell*, vol. 111, no. 3, pp. 285-291.
- Valinluck, V. & Sowers, L.C. 2007, "Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1", *Cancer research*, vol. 67, no. 3, pp. 946-950.
- Vasquez, R.J., Howell, B., Yvon, A.M., Wadsworth, P. & Cassimeris, L. 1997, "Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro", *Molecular biology of the cell*, vol. 8, no. 6, pp. 973-985.
- Waddington, C.H. 1942, *Endeavour*, vol. 1, pp. 18-20.
- Wade, P.A. 2001, "Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression", *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, vol. 23, no. 12, pp. 1131-1137.
- Wall, M.E., Wani, M.C. & Taylor, H. 1976, "Isolation and chemical characterization of antitumor agents from plants", *Cancer treatment reports*, vol. 60, no. 8, pp. 1011-1030.
- Watt, F. & Molloy, P.L. 1988, "Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter", *Genes & development*, vol. 2, no. 9, pp. 1136-1143.
- Wesley, U.V., McGroarty, M. & Homoyouni, A. 2005, "Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway", *Cancer research*, vol. 65, no. 4, pp. 1325-1334.
- Wischnewski, F., Friese, O., Pantel, K. & Schwarzenbach, H. 2007, "Methyl-CpG binding domain proteins and their involvement in the regulation of the MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, and MAGE-A12 gene promoters", *Molecular cancer research : MCR*, vol. 5, no. 7, pp. 749-759.

- Wong, J.J., Hawkins, N.J. & Ward, R.L. 2007, "Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis", *Gut*, vol. 56, no. 1, pp. 140-8.
- Yamada, Y., Jackson-Grusby, L., Linhart, H., Meissner, A., Eden, A., Lin, H. & Jaenisch, R. 2005, "Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 38, pp. 13580-13585.
- Yang, Z., Camp, N.J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D.J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., Chien, J., Dewan, A., Harmon, J., Bernstein, P.S., Shridhar, V., Zabriskie, N.A., Hoh, J., Howes, K. & Zhang, K. 2006, "A Variant of the HTRA1 Gene Increases Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration", *Science*, .
- Yoshida, M. & Beppu, T. 1988, "Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A", *Experimental cell research*, vol. 177, no. 1, pp. 122-131.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. & Beppu, T. 1990, "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A", *The Journal of biological chemistry*, vol. 265, no. 28, pp. 17174-17179.
- Zumbrunn, J. & Trueb, B. 1996, "Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins", *FEBS letters*, vol. 398, no. 2-3, pp. 187-192.
- Zupkovitz, G., Tischler, J., Posch, M., Sadzak, I., Ramsauer, K., Egger, G., Grausenburger, R., Schweifer, N., Chiocca, S., Decker, T. & Seiser, C. 2006, "Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1", *Mol Cell Biol*, vol. 26, no. 21, pp. 7913-28.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Inga Christine Irle geb. Schröder
Geburtsdatum/-ort	6. Februar 1982 in Gera - Thüringen
Familienstand	verheiratet

Studium

10/2006 bis heute	Anfertigung der Promotion an der Universität Duisburg-Essen in der Abteilung für Mikrobiologie II Thema: Epigenetische Regulation der konservierten Serinprotease HtrA1
09/2007 bis 08/2009	Weiterbildungsstudium zur Betriebswirtin (IWW) am Institut für Wirtschaftswissenschaftliche Forschung und Weiterbildung der Fernuniversität Hagen
02/2006 bis 08/2006	Masterarbeit am Zentrum für Klinische Forschung der Ruhr-Universität Bochum, Abteilung für Molekulare Gastroenterologische Onkologie Thema: PSCA-Genexpressionsregulation in Pankreas-karzinomzelllinien
10/2004 bis 09/2006	Masterstudium Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum, Schwerpunkt Molekulare Medizin
10/2001 bis 09/2004	Bachelorstudium Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum

Auszeichnung

06/2006	Wilke-Preis des Vereins zur Förderung der Chemie und Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum für den Abschluss im Master-Studiengang Biochemie
---------	---

Schule

06/2001	Abitur am städtischen Gymnasium Essen-Werden
---------	--

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Tag der mündlichen Prüfung: